

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年11月 7日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-342190

[ST.10/C]:

[JP2001-342190]

出 願 人

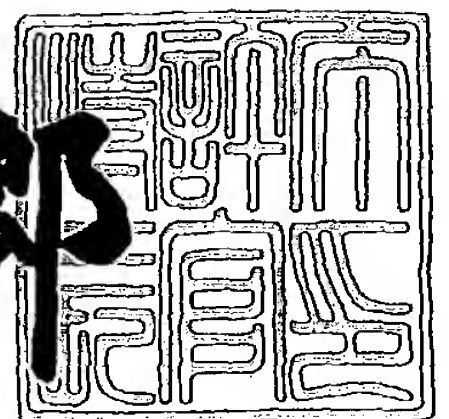
Applicant(s):

オリンパス光学工業株式会社

2003年 5月13日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3035237

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000106270

【提出日】 平成13年11月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明の名称】 蛍光輝度測定方法及び装置

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内

【氏名】 芝▲崎▼ 尊己

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内

【氏名】 大川 金保

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-395882

【出願日】 平成12年12月26日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0010297

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光輝度測定方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点の輝度を測定する蛍光輝度測定方法であって、

前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射して蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得る第 1 の撮像工程と、

前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射することにより前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得る第 2 の撮像工程と、

該第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る抽出工程と、

該 2 値化画像をマスクとして前記第 1 の画像のうち、異物領域と重なった部分の画像を無効とする異物除去工程と、

を含むことを特徴とする蛍光輝度測定方法。

【請求項 2】 前記 2 値化画像の異物領域を一定量だけ膨脹させる膨張工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 3】 測定された微小点の輝度を微小点の基準面積を用いて正規化する正規化工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 4】 前記異物除去工程後に各微小点の面積を求め、該面積と微小点の基準面積の比率によって、測定値の信頼性を判定する信頼性判定工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 5】 前記第 2 の画像をレファレンス画像により補正する補正工程をさらに有することを特徴とする請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 6】 前記抽出工程は、前記第 2 の画像から得られる微分画像を用いて前記 2 値化画像を得ることを特徴とする請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 7】 前記抽出工程は、前記 2 値化画像の 2 値化レベルを各画素に対応する微分信号の度数分布により定めることを特徴とする請求項 6 に記載の蛍

光輝度測定方法。

【請求項 8】 前記微分信号に対応する微小領域での強度で前記微分信号を規格化することを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の蛍光輝度測定方法。

【請求項 9】 略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点に励起光を照射して得られる蛍光像の輝度を測定する蛍光輝度測定装置であって、

光源と、

励起光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記蛍光物質の像を形成する為の結像手段と、

発生した蛍光の波長のみを選択する第 2 の波長選択手段と、

蛍光像を走査して画像を得る光電変換手段と、

該画像を記憶する記憶手段と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記記憶手段に記憶された前記第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る処理と、

前記 2 値化画像をマスクとして前記記憶手段に記憶された前記第 1 の画像のうち、前記異物領域と重なった部分の画像を無効とする処理と、

を行う画像処理手段と、

を具備することを特徴とする蛍光輝度測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、平面上に配列されている複数の微小な点を対象として微小点の輝度

を測定する装置に係り、特に、蛍光物質で標識されたDNAや蛋白質などの物質が高密度で微小点として平面上に配列されているバイオチップを対象として、蛍光分析を行うシステムに好適な蛍光輝度測定方法及び装置に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【従来の技術】

例えば、特開 2 0 0 0 - 1 2 1 5 5 9 号公報には、この微小点の蛍光輝度を測定する装置が開示されている。

## 【 0 0 0 3 】

図 1 2 は、上記特開 2 0 0 0 - 1 2 1 5 5 9 号公報に開示されている蛍光輝度測定装置の概略構成図である。この公報に開示の蛍光輝度測定装置は、蛍光標識を行った試料を基板表面に微小点として形成したバイオチップ 5 2 0 を図中 Y 方向に走査するチップ駆動部 5 0 3 と、励起光源としてのレーザ 5 0 6 と、該レーザ 5 0 6 からのレーザ光を反射し、被測定物からの蛍光を透過するダイクロイックミラー 5 0 8 と、集光レンズ 5 0 9 と、該集光レンズ 5 0 9 と上記ダイクロイックミラー 5 0 8 とを含む読取ヘッド 5 0 7 を図中 X 方向に走査するヘッド駆動部 5 0 2 と、前記微小点からの蛍光を波長毎に分離するダイクロイックミラー 5 1 1 と、レーザ光と蛍光を分離するフィルタ 5 1 5, 5 1 9 と、絞りレンズ 5 1 4, 5 1 8 と、ピンホール板 5 1 3, 5 1 7 と、フォトマル 5 1 2, 5 1 6 とから構成されている。

## 【 0 0 0 4 】

このような構成の蛍光輝度測定装置の作用は、次の通りである。即ち、レーザ 5 0 6 で発生したレーザ光は、ダイクロイックミラー 5 0 8 により反射されて集光レンズ 5 0 9 に向けられ、バイオチップ 5 2 0 上に集光されてレーザ光点を形成する。この時、このレーザ光点により照明された部分に蛍光物質が存在した場合には、レーザ光により蛍光物質が励起され蛍光が発生する。発生した蛍光は、集光レンズ 5 0 9 により集光されたのち、ダイクロイックミラー 5 0 8 を透過し、色分離ダイクロイックミラー 5 1 1 によって波長毎に分離され、各々の波長毎に絞りレンズ 5 1 4, 5 1 8 により集光されてピンホール板 5 1 3, 5 1 7 を通過し、フォトマル 5 1 2, 5 1 6 に入射する。フォトマル 5 1 2, 5 1 6 は、光



子を検出して TTL レベルのパルスに変換するセンサであるので、フォトマル 5 1 2, 5 1 6 に入射した光がパルス信号となり、このパルス数を測定することで微小点の蛍光輝度を測定することができる。さらに、チップ駆動部 5 0 3 とヘッド駆動部 5 0 2 によりレーザ光点を機械的に走査しながら以上の動作を実施することによって、バイオチップ 5 2 0 全体にわたる微小点の蛍光輝度を測定するものである。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、バイオチップ 5 2 0 の表面に励起光を反射したり、蛍光を発するような異物が存在すると、バイオチップ 5 2 0 上のスポット 5 2 1 からの蛍光以外に異物からのノイズとなる光を検出してしまう為、測定した輝度に誤差が生じるという点について対応することができない。

#### 【 0 0 0 6 】

また、従来の蛍光輝度測定装置では、異物の有無を判断することができない為、微小点の輝度値の信頼性について定量的な判断ができない。

#### 【 0 0 0 7 】

本発明は、上記した事情に鑑みなされたもので、バイオチップ上の表面近傍に異物が存在した場合でも、測定誤差を少なくすることが可能であり、異物の存在を認識して輝度測定値の信頼性を定量的に判断することができる蛍光輝度測定方法及び装置を提供することを目的とする。

#### 【 0 0 0 8 】

##### 【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するために、本発明による蛍光輝度測定方法は、略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点の輝度を測定する蛍光輝度測定方法であって、

前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射して蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得る第 1 の撮像工程と、

前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射することにより前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得る第 2 の撮像工程と、

該第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る抽出工程と、

該 2 値化画像をマスクとして前記第 1 の画像のうち、異物領域と重なった部分の画像を無効とする異物除去工程と、

を含むことを特徴とする。

【 0 0 0 9 】

また、本発明による蛍光輝度測定装置は、略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点に励起光を照射して得られる蛍光像の輝度を測定する蛍光輝度測定装置であって、

光源と、

励起光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記蛍光物質の像を形成する為の結像手段と、

発生した蛍光の波長のみを選択する第 2 の波長選択手段と、

蛍光像を走査して画像を得る光電変換手段と、

該画像を記憶する記憶手段と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記記憶手段に記憶された前記第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る処理と、

前記 2 値化画像をマスクとして前記記憶手段に記憶された前記第 1 の画像のうち、前記異物領域と重なった部分の画像を無効とする処理と、

を行う画像処理手段と、

を具備することを特徴とする。

【 0 0 1 0 】



即ち、本発明の蛍光輝度測定方法及び装置によれば、標識蛍光物質を励起する波長の光を照射して第1の画像を得て、前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射して得た前記被測定物に付着した異物の画像から抽出した異物領域画像によってマスクを作成し、該マスクと前記第1の画像との論理積をとることにより、前記第1の画像から異物領域を除去するので、バイオチップに付着した異物からのノイズ光を除去することができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

【0012】

〔第1の実施の形態〕

まず、本発明の第1の実施の形態に係る蛍光輝度測定方法及び装置を、図1乃至図9の(B)を用いて説明する。

【0013】

なおここで、図1は、本第1の実施の形態において微小点の輝度を測定する際のデータ処理方法の概要図である。また、図2の(A)は、本実施の形態に係る蛍光輝度測定装置の概要を示す構成図であり、図2の(B)は、バイオチップのフォーマットを示す概要図である。図3の(A)は、バイオチップに用いる蛍光物質の吸収波長と、蛍光波長の相対強度の分光特性の一例を示したものであり、図3の(B)は、蛍光測定用フィルタユニットの分光透過率特性、図3の(C)は、異物画像撮影用フィルタユニットの分光透過率特性を示したものである。図4の(A)は、1つの微小点に対する分割画像を示す図であり、図4の(B)は、図4の(A)に表示されている線分AB上のCCDからの出力信号を示す図である。図5の(A)は、異物が存在するy方向の位置におけるx方向の画素位置に対する輝度信号Sを表す図であり、図5の(B)は、最大輝度 $S_{\max}$ の $1/2$ を閾値としたときの2値化結果を示す図である。図6の(A)は、レファレンス画像の輝度分布特性を示す図である。また、図6の(B)は、2種類の異物が混在する場合の適切な閾値の設定方法を説明するためのもので、横軸を均等分割した微分信号 $S''$ の代表値、縦軸をこの微分信号 $S''$ に該当する画素の総数とす

る度数分布図である。図 7 の (A) は、図 5 の (A) の輝度信号にレファレンス輝度信号  $S_R$  に対する最大輝度信号  $S_{Rmax}$  の比  $S_{Rmax}/S_R$  を乗じた値を輝度信号  $S'$  とした場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する輝度信号  $S'$  を表す図であり、図 7 の (B) は、最大値  $S_{max}'$  の  $1/2$  を閾値としたときの 2 値化結果を示す図である。また、図 8 の (A) は、一次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図であり、図 8 の (B) は、二次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図である。そして、図 9 の (A) は、微分信号を別な手法により求めたときの一次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図であり、図 9 の (B) は、同様に微分信号を別な手法により求めたときの二次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図である。

## 【 0 0 1 4 】

即ち、図 2 の (A) に示すように、本実施の形態に係る蛍光輝度測定装置においては、照明ユニット 1 は、水銀ランプ等の光源 2 を有し、この光源 2 から投射された光束は、コレクタレンズ 3 で集光され、開口絞り 4 及び視野絞り 5 で絞られた後、レンズ 6 を介してフィルタセット 7 に入射されるように構成されている。

## 【 0 0 1 5 】

また、本実施の形態においては、図 3 の (A) に示すような特性を有する蛍光物質を標識物質として使用する。即ち、同図中、参照番号 26 で示すような吸収スペクトルと、該吸収スペクトル 26 よりも長波長の発光スペクトル 27 を有するものである。

## 【 0 0 1 6 】

蛍光測定用フィルタセット 7 は、図 3 の (B) に示したように、標識物質として用いた図 3 の (A) に示した特性を有する蛍光物質が励起される光の波長を選択的に透過する分光透過率特性 28 を有する波長選択フィルタ 8 (以下、励起フ

ィルタと表記する) と、該励起フィルタ 8 で透過した波長の光を反射し且つバイオチップ上の微小点の標識蛍光物質から発生した蛍光の波長だけを一定の波長帯域で透過する分光特性 2 9 を有するダイクロイックミラー 9 と、バイオチップ上の微小点の標識蛍光物質から発生した蛍光の波長のみを選択的に透過し且つ不要波長成分を吸収する分光透過率特性 3 0 を有する波長選択フィルタ 1 0 (以下、吸収フィルタと表記する) と、で構成されている。

## 【 0 0 1 7 】

また、異物画像撮影用フィルタセット 1 1 は、図 3 の (C) に示したような、標識物質として用いた蛍光物質が励起されず、バイオチップ上の異物で反射もしくは異物が蛍光を発する波長の光を選択的に透過する分光透過率特性 3 1 を有する波長選択フィルタ 1 2 と、該波長選択フィルタ 1 2 で透過した光を反射し、バイオチップ上の異物で発生した蛍光又は異物で反射した光を透過する分光特性 3 2 を有するダイクロイックミラー 1 3 と、発生した異物からの蛍光または異物で反射した光の波長のみを選択的に透過する分光特性 3 3 を有するフィルタ 1 4 と、から構成されている。

## 【 0 0 1 8 】

これらのフィルタセット 7, 1 1 は、フィルタセット取付部材 1 5 に取り付けられ、一方のフィルタセットが照明光軸と観察光軸の交点とダイクロイックミラー 9, 1 3 が一致するように配置され、後述するようなフィルタセット制御手段 2 0 からの切換え信号に基づき、フィルタセット切替機構 1 6 により、切替えられるように構成されている。

## 【 0 0 1 9 】

バイオチップ 2 4 は、図 2 の (B) に示すように、例えば、1 0 m m × 2 0 m m の方形のガラス板で作られており、その表面には、例えば、F I T C (フルオロセインイソチオシアネート) やローダミン等の蛍光物質により標識した D N A や蛋白質などの被検体が、例えば直径が 5 0  $\mu$  m の微小な略円形の微小点 2 5 として、例えば 1 0 0  $\mu$  m の間隔で格子状に配列してあるものである。さらに、微小点を形成してある領域を認識する目的で、標識に用いた蛍光物質を位置検出用微小点 3 5 として、隅部に 4 つ形成してある。また、このバイオチップ 2 4 は、

図示しない2軸(XY)ステージ上に設置され、水平面内で移動することができるようになっており、対物レンズ34の視野内に位置決めできるようになっている。

#### 【0020】

対物レンズ34は、バイオチップ24の上方に、その作動距離だけ離れて設置してあり、バイオチップ24を励起照明して発生した蛍光が、この対物レンズ34を通して集光され、結像レンズ17を通して光電変換素子としてのCCD素子18上に前記バイオチップ24の像を形成するように、観察光路を形成している。このような装置の一例として、一般の落射蛍光顕微鏡を用いることができる。なお、本実施の形態では、照明方法として同軸落射照明を採用しているが、観察光路を外れて偏斜照明とすることもでき、また、照明光を輪帯として、暗視野落射照明とすることもできる。

#### 【0021】

CCD素子18は、バイオチップ24の蛍光像を電氣的に走査してアナログ画像信号を出力するものである。制御手段23は、このアナログ信号をデジタルデータに変換するA/D変換器19と、画像メモリ21とを有し、さらに、画像の2値化機能、複数の画像間の論理積を行う機能、任意領域の面積を測定する機能、任意領域内の輝度値を積算する機能、を有する画像処理手段22と、四則演算を行う演算手段42と、フィルタセット制御手段20と、から構成されている。

#### 【0022】

次に、図2の(A)及び図4の(B)を用いて、本実施の形態の作用を説明する。

#### 【0023】

まず、バイオチップ24上の4つの位置決め用微小点35で規定されている測定範囲が観察光学系の像倍率とCCD素子18の受光面サイズにより決定される視野範囲と一致するように、図示しない2軸ステージによりバイオチップ24を位置決めする。次いで、フィルタセット切替機構16により、バイオチップ24上の微小点25の蛍光画像を撮影するように、蛍光測定用フィルタセット7が撮影位置に位置決めされる。



## 【0024】

一方、光源2から発した光束は、コレクタレンズ3によって集光され、開口絞り4及び視野絞り5で絞られた後、レンズ6を介して蛍光測定用フィルタセット7に導かれる。この蛍光測定用フィルタセット7に導かれた光は、標識蛍光物質の吸収波長域26に一致する分光透過特性28を有する励起フィルタ8によって特定の半値巾を持つ波長の光束となる（以下、励起光と称する）。ダイクロイックミラー9が分光特性29を有しているので、この光束は、ダイクロイックミラー9によって反射され、対物レンズ34を通してバイオチップ24上に照射される。この時、バイオチップ24上の微小点25として配列された蛍光物質は、その物性及び環境により決定する励起光よりも長い波長を有する蛍光を発する。各々の微小点25を発した蛍光は、対物レンズ34によって集光され、ここで発生した蛍光は、ダイクロイックミラー9の透過波長域であるので蛍光測定用フィルタセット7のダイクロイックミラー9を透過し、さらに吸収フィルタ10を透過して、CCD素子18上に微小点25の像を形成する。

## 【0025】

この後、CCD素子18上の微小点25の像をCCD素子18により電氣的に走査して、アナログ電気信号に変換する。このアナログ信号は、A/D変換器19によりデジタル信号に変換され、図1に示す微小点の蛍光画像101として画像メモリ21に記憶される。

## 【0026】

次に、フィルタセット切替機構16により、蛍光測定用フィルタセット7から異物画像撮影用フィルタセット11に切替えて、蛍光物質が励起されない光の波長の照明光をバイオチップ24に与え、上記ステップと同様の操作にて図1に示す異物画像102を画像メモリ21に記憶させる。このとき、微小点25の標識蛍光物質は励起されないので、異物画像102には微小点25の像は含まれない。

## 【0027】

次に、異物画像102から異物領域を抽出するため、画像処理手段22により、この異物画像102に対して2値化処理を行う。このとき、一般に、均一輝度

の物体を無収差レンズで  $\gamma$  値が「1」の受光素子上に結像した場合、得られた画像の最大輝度の  $1/2$  を閾値として2値化した時の境界が、主光線と最適像面との交点と考えられ、得られた2値化領域を異物の外形として採用できる。

## 【0028】

ただし、バイオチップ24上に照射される励起光に空間的なむらが存在する場合、異物が発する蛍光の輝度にも空間的なむらが生じてしまう。そして、一律に最大輝度の  $1/2$  を閾値とすれば、同一の異物が複数存在すると仮定しても、励起光の空間的なむらに起因して一部の異物が異物として認識されないということが生じ得る。

## 【0029】

この現象について、図5の(A)及び(B)を用いて詳細に説明する。図5の(A)は、異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する輝度信号  $S$  を表す図である。図に示すように、励起光に空間的なむらが存在する場合、同一特性の異物が複数個(図ではA、B及びCの3個とした)存在する時に、同一の輝度信号が得られない。今、異物Aが最も大きな輝度信号とし、これを  $S_{\max}$  とし、異物B及び異物Cの輝度信号をそれぞれ  $S_1$  及び  $S_2$  とし、 $S_{\max}/2 < S_1 < S_{\max}$ 、 $S_2 < S_{\max}/2$  の場合には、一律に最大輝度の  $1/2$  を閾値とすれば、図5の(B)に示すように、異物Aのみが、2値化した時の境界が主光線と最適像面との交点に一致することになり、正確な領域を示すが、異物Bにおいては、正確な領域よりも小さくなってしまう。さらに、異物Cにおいては、全く認識されないことになる。

## 【0030】

次に、この欠点を除去する方法について説明する。

その第一の方法は、励起光のむらを測定し、これにより補正する方法である。このために、均一な反射率又は発光率を有する平板の画像(レファレンス画像)を、例えば図6の(A)に示すような輝度分布特性として撮り込む(実際には二次元の輝度分布であるが、ここでは便宜上一次元で表示してある)。なお、図6の(A)において、縦軸はレファレンス輝度信号  $S_R$  とし、その最大値を最大輝度信号  $S_{R\max}$  とする。次に、図5の(A)に示す如く得られた輝度信号  $S$  に  $S$



$R_{\max}/S_R$  を乗じた値を輝度信号  $S'$  とすれば、図 7 の (A) に示す如く 3 個の異物の輝度信号  $S'$  は等しくなる。従って、輝度信号  $S$  を用いる代りに、この輝度信号  $S'$  の最大値  $S_{\max}'$  の  $1/2$  を閾値とすれば、図 7 の (B) に示す如く 3 個とも同様に、2 値化した時の境界が、主光線と最適像面との交点に一致することになり、正確な領域を示す。以上は、異物以外の輝度を 0 として説明したが、迷光や受光素子の暗電流などによりノイズが混入することが有るので、さらに望ましくは、閾値を  $(S_{\min}' + S_{\max}')/2$  とする方が良い。ここで  $S_{\min}'$  は輝度信号  $S'$  の最小値である。

## 【 0 0 3 1 】

次に、同じくこの欠点を除去する第二の方法について説明する。この方法は、上述の第一の方法と異なり、レファレンス画像を不要とする方法である。

## 【 0 0 3 2 】

即ち、今、輝度信号  $S$  を  $f(i, j)$  で表し、式

【数 1】

$$S'' = \frac{g(i, j)}{\sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{0,m,n} f(i+m, j+n)}$$

を用いて微分信号  $S''$  を求めるものとする。ここで  $(i, j)$  を中心とする  $i$  方向及び  $j$  方向の近傍（隣接画素に限定しない）は、それぞれ  $[-m_1, m_2]$  及び  $[-n_1, n_2]$  で表される。また、 $C_{0,m,n}$  は平均オペレータであり、通常は

【数 2】

$$C_{0,m,n} = \frac{\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}}{9} \quad \text{又は} \quad \frac{\begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}}{16}$$

が与えられる。さらに  $g(i, j)$  は微分画像を表し、

【数 3】

$$g(i, j) = \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{1,m,n} f(i+m, j+n)$$

又は、

【数 4】

$$g(i, j) = \left| \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{1,m,n} f(i+m, j+n) \right| \\ + \left| \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{2,m,n} f(i+m, j+n) \right|$$

で表される。ここで、 $C_{1,m,n}$  及び  $C_{2,m,n}$  は微分オペレータであり、例えば一次微分オペレータとしては、

【数 5】

$$C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad C_{2,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

又は、

【数 6】

$$C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad C_{2,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

が多く用いられ、二次微分オペレータとしては、ラプラシアンフィルタとして知られる、

【数 7】

$$C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \quad \text{又は} \quad C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix}$$

が多く用いられる。

【0 0 3 3】

このようにして求められた微分信号  $S''$  は、一次微分オペレータを用いる場合は図 8 の (A) に示す如く 3 個とも同一の微分信号となり、異物の輪郭線は最大微分信号  $S_{\max}''$  で一定幅の線となる。この幅の中心を結ぶ線が実際の異物輪郭線となる。また、二次微分オペレータを用いる場合は図 8 の (B) に示す如く、3 個とも同一の微分信号となり、微分信号  $S''$  の正負が反転する点で結ばれる線が異物輪郭線となる。

【0 0 3 4】

なお、これまでは何れの場合も便宜上、輝度信号  $S$  の境界付近の傾きが一定として説明したが、実際にはこの傾きは一定ではなく、そのため図 8 の (A) 及び図 8 の (B) の微分信号  $S''$  のパターンは矩形分布でなく、正規分布に近いパターンとなるので、閾値を用いて処理された信号を用いて異物領域を決定するか、又は微分信号  $S''$  のピーク点を用いて異物領域を決定することが望ましい。ただし、前者の場合は、原理上必ずしも閾値を最大微分信号  $S_{\max}''$  の  $1/2$  とする必要はない。また、後者の場合は、微分信号  $S''$  を求める式を前述の式ではなく、単に式

$$S'' = g(i, j)$$

としても十分である。即ち、図 9 の (A) 及び (B) に示す如くである。図 9 の (A) においては、 $S''$  の極大値に対応する点で形成される領域を異物領域とし、図 9 の (B) においては、 $S''$  の極大値に対応する点と極小値に対応する点との中央点で形成される領域を異物領域とするものである。

【0 0 3 5】

次に、前者の場合のさらに適切な閾値の設定方法について説明する。

即ち、これまでは、1種類の同一の異物について説明してきたが、実際には複数種類の異物が存在する。今、異物1及び異物2が混在する場合の適切な閾値の設定方法について説明する。図6の(B)は、横軸を均等分割した微分信号 $S''$ の代表値、縦軸をこの微分信号 $S''$ に該当する画素の総数(以後、度数と称する)とする度数分布図である。同図に示すように、微分信号 $S''$ の小さいゾーンにノイズが集中的に現れ、異物1及び異物2はそれらの特性に応じて固有のゾーンに散発的に現れる。従って、この度数分布図を用いて閾値を設定することができる。即ち、図示の閾値1を採用すれば異物1及び異物2の輪郭線を得ることができ、図示の閾値2を採用すれば異物2のみの輪郭線を得ることができる。さらに、閾値1及び閾値2を採用すれば異物1のみの輪郭線を得ることができる。

## 【0036】

最後に、画像処理手段22により異物の輪郭線とその内部を例えば0または-1、他の部分を1としたものを異物領域画像103として画像メモリ21に記憶する。

## 【0037】

さらに、微小点25の蛍光画像101に対して、この異物領域画像103をマスクとして、画像処理手段22により2つの画像間の積をとり、異物領域を除去した微小点25の蛍光画像104を得る。即ち、0又は-1の値の領域が異物領域として認識できる蛍光画像104を得ることができる。

## 【0038】

また、ここでは2値化処理により得られた領域を直接、異物領域として採用して、微小点25の蛍光画像101から除去するようにしているが、2値化して得られた異物領域に対して、回折像の中心から二次の回折ピークと三次の回折ピークとの間の谷までの距離(回折によるボケ量、以下の(1)式の右辺第1項)と、フォーカシング誤差を考慮した時の最大ボケ量((1)式の右辺第2項)との和として、光学的なボケの量を以下の(1)式で与え、この量だけ異物領域を膨脹させ、微小点の蛍光画像から除去するようにしても良い。但し、 $\beta$ は光学系の像倍率、 $\lambda$ は異物の像を形成する光の波長、 $\alpha$ は対物レンズ34のバイオチップ側の開口数、 $\Delta$ はデフォーカス量である。

【 0 0 3 9 】

【数 8】

$$\delta = \beta \cdot \left( 1.619 \frac{\lambda}{\alpha} + \alpha |\Delta| \right) \quad \dots (1)$$

【 0 0 4 0 】

次に、バイオチップ 2 4 上に形成した位置検出用微小点 3 5 を検出して、4 つの位置検出用微小点 3 5 の重心位置、又は位置検出用微小点 3 5 の 2 値化画像の図心位置を求め、この座標とバイオチップ 2 4 の配列情報から、前記微小点の蛍光画像 1 0 4 を、参照番号 1 0 5 で示したように、各々の微小点単位に分割する。

【 0 0 4 1 】

そして、次の手順で、各微小点 2 5 に対する測定領域を設定する。

【 0 0 4 2 】

即ち、異物領域を除去した微小点毎の分割画像 1 0 6、1 0 7 に対して、分割画像内の最大輝度の  $1/2$  又は最大輝度と最小輝度の平均値を閾値として 2 値化処理を行い、2 値化領域の最大 X 座標、最小 X 座標、最大 Y 座標、及び最小 Y 座標を求め、それぞれ  $x_{\max}$ 、 $x_{\min}$ 、 $y_{\max}$ 、 $y_{\min}$  とする。これらの座標を元に、測定領域及びノイズサンプリング領域を決定する為の矩形領域を与える 2 つの座標を図 4 の (A) に示すように  $(x_{\min}', y_{\min}')$  及び  $(x_{\max}', y_{\max}')$  として、以下の式で与える。

【 0 0 4 3 】

$$x_{\min}' = x_{\min} - \delta \quad \dots (2)$$

$$y_{\min}' = y_{\min} - \delta \quad \dots (3)$$

$$x_{\max}' = x_{\max} + \delta \quad \dots (4)$$

$$y_{\max}' = y_{\max} + \delta \quad \dots (5)$$

なお、ここでは、測定領域として矩形領域を考えたが、前記 2 値化領域に対して上記 (1) 式で決まる量だけ、領域の形状を保ったまま膨脹させた領域を採用しても良い。

## 【 0 0 4 4 】

次に、前記 2 値化領域に相当する物体としての微小点の実面積を、画素数と光学系の倍率から計算し、これを  $D$  とする。ここで、バイオチップ 2 4 を作成する際に設定した、微小点の標準面積  $D_0$  と測定した微小点の面積  $D$  とから、以下の (6) 式を計算する。

## 【 0 0 4 5 】

$$\sigma = D_0 / D \quad \dots (6)$$

このとき、分割画像 1 0 6 に示したように微小点 2 5 が異物で覆われていない場合は、

## 【数 9】

$$\sigma \approx 1$$

となるが、分割画像 1 0 7 に示したように微小点が異物で覆われている場合には、 $\sigma \gg 1$  となる。この  $\sigma$  を用いて、例えば  $\sigma < 10$  の場合にだけ輝度測定を実施し、これに合致しない場合には、異物や、微小点そのものの欠陥として、その微小点に関するデータは信頼性がないものと判定する。

## 【 0 0 4 6 】

次に分割画像 1 0 6 に対して以下の処理を行う。

## 【 0 0 4 7 】

即ち、CCD 素子 1 8 から得られる画像信号には、通常、ノイズが含まれる。このノイズ成分は、装置構成や測定環境に依存するが、一般的には、励起光の基板（バイオチップ 2 4）での反射光、励起光による基板の自家発光に基づく励起光ノイズ（励起光に起因するノイズ）が支配的であり、時には迷光ノイズ（励起光以外の光源に起因するノイズ）も無視できない。なお、図 4 の (A) 及び (B) は、説明し易いようにモデル化して表現してあるが、実際には検出されるべき信号及びノイズ信号は平坦ではなく、位置によりむらがある。特に、前述の励起光ノイズは照明むらを反映するので、ノイズ成分のむらの最大原因となる。

## 【 0 0 4 8 】

そこで、本実施の形態においては、分割画像領域内であり且つ測定領域外の領



域をノイズサンプリング領域として、ノイズサンプリング領域内の信号の総和をノイズサンプリング領域の面積で除することで求められるの平均ノイズ信号を、測定領域内の画素に対する信号から減算する。

## 【 0 0 4 9 】

次に、差し引かれて得られた検出信号の測定領域内での総和を微小点の信号強度  $P_0$  とする。さらに、微小点の信号強度  $P_0$  を微小点の実面積で補正して（正規化処理）、微小点の輝度測定値  $P$  とし、次の（7）式によりこの  $P$  を求める。なおここで、 $D_0$  は微小点の標準面積、 $D$  は先に計算された各微小点の2値化画像から求めた実面積である。

## 【 0 0 5 0 】

$$P = (D_0 / D) P_0 \quad \dots (7)$$

この補正即ち正規化処理により、微小点形成誤差によるノイズ、また、異物により微小点25の一部が隠れた場合の誤差を除去することができる。

## 【 0 0 5 1 】

なお、本実施の形態のようなCCD素子18等を用いた電氣的な走査によってバイオチップ24の像を一括して撮像し、画像メモリに記憶するようにしているが、これに限らず、従来のように機械的な走査を行ってバイオチップ24の像を分割して撮像し、画像メモリ上でバイオチップ24の全体像を得るようにしても良いことは勿論である。さらに、両者を組み合わせることで、CCD素子18では一度に全体を撮像できないような大きなバイオチップを使用することも可能となる。

## 【 0 0 5 2 】

また、この実施の形態には、本発明の効果のほかに、次のような特有の効果がある。

## 【 0 0 5 3 】

即ち、CCD素子18を用いている為、バイオチップ24の像を一括して処理することができ、測定時間の短縮を図ることができる。また、一方で、露出時間を長く取ることも可能である為、輝度の測定感度の点でも有利である。なお、本実施の形態における各構成は、当然、各種の変形、変更が可能である。例えば、

画像処理装置はパーソナルコンピュータとすることができ、CCD素子18にはペルチェ素子等で冷却されているタイプの冷却CCDを用いることができる。

【0054】

また、異物領域を膨脹させて微小点の蛍光画像から除去すれば、光学系の焦点合わせに関わる誤差を吸収することができ、微小点の蛍光画像から異物のノイズ光の影響をさらに低下させることができる。

【0055】

さらに、本実施形態においては、検出されるべき信号のむらにより2値化領域が図示のような円形でない場合、又は1つの分割画像に複数の2値化領域が存在する場合でも、 $(x_{min}', y_{min}')$  及び  $(x_{max}', y_{max}')$  で定まる矩形領域を測定領域とすることで、この測定領域内に検出されるべき全ての信号が含まれることが保証される。

【0056】

また、微小点近傍でノイズサンプリング領域を設定して、微小点からの信号強度を補正しているので、検出されるべき信号の検出精度が向上する。しかも、前述の如くデフォーカスを考慮して測定領域を設定してあるので、デフォーカスノイズが発生しないことも明らかである。

【0057】

〔第2の実施の形態〕

次に、本発明の第2の実施の形態に係る蛍光輝度測定方法及び装置を、図10の(A)乃至図11を用いて説明する。

【0058】

なおここで、図10の(A)は、本第2の実施の形態に係る蛍光輝度測定装置の概要を示す構成図であり、図10の(B)は、レファレンスチップの概要図である。また、図11は、本実施の形態による測定方法を示すフローチャートである。

【0059】

本実施の形態においては、図10の(A)に示すように、CCD素子18に入射する光量を調整する目的で、結像レンズ17とCCD素子18の間の光路上に

、それぞれ既知の透過率を有する複数のNDフィルタ39を選択的に挿入する構成としている。即ち、NDフィルタ39は、フィルタ保持手段40に複数取り付けられており、NDフィルタ制御手段38からの司令に基づき、NDフィルタ切替手段41により、光路に挿入される透過率の異なるNDフィルタが切替えられるようになっている。

#### 【0060】

また、本実施の形態においては、図2の(B)に示すバイオチップ24に加えて、図10の(B)に示すレファレンスチップ36も用いるものである。ここで、レファレンスチップ36は、平面ガラス等の基板に蛍光標識として使用する蛍光物質を、上記バイオチップ24の微小点25と同一の位置に既知の蛍光分子数を有する参照微小点37と、バイオチップ24と同様に微小点群の4隅に標識と同一の蛍光分子をそれぞれ位置検出用微小点35として転着してある。

#### 【0061】

なお、転着の方法は、使用する蛍光分子の重量とその分子量から使用する蛍光分子数を特定し、この蛍光分子数の蛍光分子の溶液を既定量となるように作り、この溶液を一定量だけインクジェット方式により基板上に吐出するものである。また、ピンに溶液を付着させて基板に接触させるような方法によっても良い。なお、参照微小点1つ当たりの蛍光分子数はこれらの諸量（溶液量及び溶液中の蛍光分子数）と溶液の吐出量から計算して求められる。また、蛍光分子の保持方法として固相化試薬を用いると確実な保持が可能であるが、必ずしも必要としない。

#### 【0062】

このレファレンスチップ36は、図10の(A)に示したように図示しない2軸ステージ上に上記バイオチップ24と同一の平面内に設置されており、2軸ステージにより、光学系の視野内に位置決めできるようになっている。

#### 【0063】

その他の構成は、前述の第1の実施の形態と同一であるので、説明を省略する。

#### 【0064】

次に、かかる構成の蛍光輝度測定装置を用いた測定方法を、図 1 1 のフローチャートを用いて説明する。

## 【 0 0 6 5 】

まず、レファレンスチップ 3 6 を対物レンズ 3 4 の視野と一致するように位置決めする（ステップ S 1）。

## 【 0 0 6 6 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 上の 4 つの位置決め用微小点 3 5 で規定されている測定範囲が観察光学系の像倍率と CCD 素子 1 8 の受光面サイズとにより決定される視野範囲内に包含されるように、図示しない 2 軸ステージによりレファレンスチップ 3 6 を位置決めする。

## 【 0 0 6 7 】

次に、蛍光測定用フィルタセット 7 を撮影位置に位置決めする（ステップ S 2）。

## 【 0 0 6 8 】

即ち、フィルタセット切替機構 1 6 により、レファレンスチップ 3 6 上の参照微小点 3 7 の蛍光画像を撮影するように、蛍光測定用フィルタセット 7 を撮影位置に位置決めする。

## 【 0 0 6 9 】

次に、ND フィルタ 3 9 を切替えながらレファレンスチップ 3 6 の蛍光画像を CCD 素子 1 8 で撮影する（ステップ S 3）。

## 【 0 0 7 0 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 を励起照明して参照微小点 3 7 内の蛍光分子が発生する蛍光の画像を複数枚の ND フィルタ 3 9 を切替えながら撮り込む。なお、本実施の形態において、受光素子として CCD 素子 1 8 を用いているが、CCD 素子に特定するものではなく、他のエリアセンサでも構わない。従って、以下に記述される「CCD 素子」はエリアセンサでも通用するものである。

## 【 0 0 7 1 】

次に、ND フィルタ 3 9 を切替えながらレファレンスチップ 3 6 のバックグラウンド画像を CCD 素子 1 8 で撮影する（ステップ S 4）。

## 【 0 0 7 2 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 の蛍光画像を撮り込んだ直後に励起照明を遮断して、バックグラウンド画像を撮り込む。このバックグラウンド画像は、検出強度に不要な暗電流及び迷光により構成される。

## 【 0 0 7 3 】

次に、レファレンスチップ 3 6 を視野から外し、バイオチップ 2 4 を視野内に位置決めする（ステップ S 5）。

## 【 0 0 7 4 】

即ち、バイオチップ 2 4 上の 4 つの位置決め用微小点 3 5 がレファレンスチップ 3 6 の位置決め用微小点 3 5 の位置と略一致するように、図示しない 2 軸ステージによりバイオチップ 2 4 を位置決めする。

## 【 0 0 7 5 】

次に、ND フィルタ 3 9 を切替えながら、バイオチップ 2 4 の蛍光画像を CCD 素子 1 8 で撮影する（ステップ S 6）。

## 【 0 0 7 6 】

即ち、バイオチップ 2 4 を励起照明して各微小点内の蛍光分子が発生する蛍光の画像を CCD 素子 1 8 で撮り込む。この際、複数枚の ND フィルタ 3 9 を切替えながら蛍光画像を撮り込む。

## 【 0 0 7 7 】

次に、ND フィルタ 3 9 を切替えながら、バイオチップ 2 4 のバックグラウンド画像を CCD 素子 1 8 で撮影する（ステップ S 7）。

## 【 0 0 7 8 】

即ち、バイオチップ 2 4 の蛍光画像を撮り込んだ直後に励起照明を遮断して、バックグラウンド画像を撮り込む。このバックグラウンド画像は、レファレンスチップ 3 6 のバックグラウンド画像と同様に、検出強度に不要な暗電流及び迷光により構成される。

## 【 0 0 7 9 】

次に、異物画像撮影用フィルタセット 1 1 に切替える（ステップ S 8）。

## 【 0 0 8 0 】

即ち、フィルタセット切替機構 1 6 により、バイオチップ 2 4 上の異物の画像を撮影するように、異物画像撮影用フィルタセット 1 1 を撮影位置に位置決めする。

【 0 0 8 1 】

その後、バイオチップ上の異物の画像を撮影する（ステップ S 9）。

【 0 0 8 2 】

即ち、バイオチップ 2 4 上の異物を標識蛍光物質が励起されない波長の光で照明して、異物が発生する蛍光（自家蛍光）または反射光により、異物の画像を C D 素子 1 8 で撮り込む。

【 0 0 8 3 】

そして、異物画像を 2 値化する（ステップ S 1 0）。

【 0 0 8 4 】

即ち、撮影した異物画像またはこれの微分画像を特定の閾値で 2 値化して異物領域を特定し、この画像を 2 値化異物画像とする。

【 0 0 8 5 】

次に、レファレンスチップ 3 6 とバイオチップ 2 4 の蛍光画像から各々のバックグラウンド画像を差し引き、補正画像とする（ステップ S 1 1）。

【 0 0 8 6 】

即ち、一般的に受光素子の出力には暗電流ノイズや迷光ノイズなどの直流ノイズが含まれる。この直流ノイズを除去する為にレファレンスチップ 3 6 及びバイオチップ 2 4 について各々蛍光画像からバックグラウンド画像を差し引き、これを補正画像と称し以後の処理の対象とする。これを N D フィルタ別に行う。

【 0 0 8 7 】

その後、各補正画像中の位置検出用微小点に対応する画像の重心位置を検出する（ステップ S 1 2）。

【 0 0 8 8 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 及びバイオチップ 2 4 に形成される微小点 2 5 及び参照微小点 3 7 は、図 2 の（B）及び図 1 0 の（B）に示すように、2 次元に配列されており、共に 4 隅に位置する 4 個の微小点が位置検出用微小点 3 5 と



して用いられる。位置検出用微小点 3 5 は位置信号を出す為のものであるから、その要素内の物質は発光物質又は反射物質であれば何でも良いことになるが、標識として使用される蛍光物質の蛍光波長とは異なる蛍光波長の蛍光物質を用いるほうが好ましい。この理由は、位置検出用微小点 3 5 から発生する蛍光がノイズとして作用する可能性を無くすことができるからである。この場合には、位置検出用微小点 3 5 に特有の励起波長で照明して位置検出をすることになる。位置検出には、4 個の位置検出用微小点 3 5 それぞれの重心座標を位置座標とする方法や、補正画像を最大強度の  $1/2$  のレベルで 2 値化して 4 個の図心を位置座標とする方法などを採用する。

## 【 0 0 8 9 】

そして、各補正画像を回転移動して、ND フィルタ別の回転画像とする（ステップ S 1 3）。

## 【 0 0 9 0 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 及びバイオチップ 2 4 について各々得られた 4 つの位置検出用微小点 3 5 の位置座標で形成される 4 辺形が最小偏差で矩形となるように位置座標を修正してから、この矩形の各辺が画像の座標軸と平行となるように画像中心を回転中心として補正画像を回転移動する。移動後の画像を回転画像と呼ぶ。この時、2 値化異物画像についてもバイオチップ 2 4 と同じ量だけ回転移動させる。

## 【 0 0 9 1 】

次に、バイオチップ 2 4 の蛍光画像に対して、2 値化異物画像をマスクとして異物領域に一致する蛍光画像の輝度情報を無効にする（ステップ S 1 4）。

## 【 0 0 9 2 】

即ち、画像処理手段 2 2 により 2 値化異物画像として得られた画像とバイオチップ 2 4 の蛍光画像との論理積を行い、2 値化異物領域と一致するバイオチップ 2 4 の蛍光画像の画素の輝度データを「0」にする。

## 【 0 0 9 3 】

その後、各回転画像を参照微小点 3 7 及び微小点 2 5 毎の画像に分割し、各々、ND フィルタ別、及び微小点別の分割画像とする（ステップ S 1 5）。

## 【 0 0 9 4 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 及びバイオチップ 2 4 の各回転画像に関する位置決め用微小点 4 個の位置座標と参照微小点 3 7 及び微小点 2 5 の配列条件とから分割条件を決定して、この分割条件ですべての回転画像を参照微小点 3 7 又は微小点 2 5 毎の画像に分割し分割画像とする。

## 【 0 0 9 5 】

そして、最適な ND フィルタ 3 9 に対応する各分割画像を要素別の測定用画像として抽出する（ステップ S 1 6）。

## 【 0 0 9 6 】

即ち、レファレンスチップ 3 6 上の同一位置の参照微小点 3 7 に対する ND フィルタ枚数分のレファレンス分割画像の中から最大信号強度が CCD 素子 1 8 のダイナミックレンジの範囲内にあり、その中で強度信号が最大であるレファレンス分割画像を 1 個抽出し、これを測定用レファレンス画像と呼ぶ。同様に、バイオチップ 2 4 上の同一位置の微小点 2 5 に対する ND フィルタ枚数分の分割画像の中から最大信号強度が CCD 素子 1 8 のダイナミックレンジの範囲内にあり、その中で信号強度が最大である分割画像を 1 個抽出し、これを測定用サンプル画像と呼ぶ。測定用レファレンス画像及び測定用サンプル画像は、各々撮影時に使用した ND フィルタ 3 9 の透過率  $T_k$  が大きなものから順次、補正輝度  $R_k$ （＝分割画像中の最大強度×撮影に使用した ND フィルタ 3 9 の透過率）を求める。ここで  $k$  は透過率の大きな順に ND フィルタに付与した番号である（ $k = 1 \sim n$ ）。この  $R_k$  の変化率（＝ $(P_{k+1}/T_{k+1}) - (P_k/T_k)$ ）が負の条件を満たした時に ND フィルタ番号  $k$  に対応する画像を抽出する。

## 【 0 0 9 7 】

次に、上記抽出した各測定用画像を 2 値化し、要素別の 2 値化画像とする（ステップ S 1 7）。

## 【 0 0 9 8 】

即ち、測定用レファレンス画像及び測定用サンプル画像の全てについて、各々の画像における最大信号と最小信号の平均値を閾値として 2 値化し、これらを各々レファレンス 2 値化画像及びサンプル 2 値化画像とする。ここで、サンプル 2

値化画像については2値化領域の面積Dを計算する。

【0 0 9 9】

その後、各2値化画像により測定領域及びノイズサンプリング領域を設定する(ステップS18)。

【0 1 0 0】

即ち、レファレンス2値化画像のすべてについて、各々の最大X座標 $x_{Rmax}$ 、最小X座標 $x_{Rmin}$ 、最大Y座標 $y_{Rmax}$ 、最小Y座標 $y_{Rmin}$ を求める。同様に、サンプル2値化画像の全てについて、各々の最大X座標 $x_{Smax}$ 、最小X座標 $x_{Smin}$ 、最大Y座標 $y_{Smax}$ 、最小Y座標 $y_{Smin}$ を求めてから、ノイズのサンプリング領域を設定するための座標 $x_{Rmax}'$ 、 $x_{Rmin}'$ 、 $y_{Rmax}'$ 、 $y_{Rmin}'$ 、 $x_{Smax}'$ 、 $x_{Smin}'$ 、 $y_{Smax}'$ 、及び $y_{Smin}'$ を次式により算出する。

【0 1 0 1】

$$x_{min}' = x_{min} - \delta \quad \dots (8)$$

$$y_{min}' = y_{min} - \delta \quad \dots (9)$$

$$x_{max}' = x_{max} + \delta \quad \dots (10)$$

$$y_{max}' = y_{max} + \delta \quad \dots (11)$$

但し、 $\delta$ は光学系のボケ量を与える量であり次式で与えられる。

【0 1 0 2】

【数10】

$$\delta = \beta \cdot \left( 1.619 \frac{\lambda}{\alpha} + \alpha |\Delta| \right) \quad \dots (12)$$

なお、 $\beta$ は光学系の像倍率、 $\lambda$ は微小点25及び参照微小点37の像を形成する光の波長、 $\alpha$ は対物レンズ34のバイオチップ側の開口数、 $\Delta$ はデフォーカス量である。

【0 1 0 3】

ここで算出した点 $(x_{Rmin}', y_{Rmin}')$ 及び点 $(x_{Rmax}', y_{Rmax}')$ で定まる矩形内を測定用レファレンス画像の測定領域とし、該矩形外を測定用レファレンス画像のノイズサンプリング領域とする。同様に、点 $(x_{Smin}', y_{Smin}')$ 及び点 $(x_{Smax}', y_{Smax}')$ で定まる矩形内を測定用サンプル画像の測定領

域とし、該矩形外を測定用サンプルのノイズサンプリング領域とする。

【0 1 0 4】

次に、測定用画像上で測定領域の信号から平均ノイズ信号を差し引く（ステップ S 1 9）。

【0 1 0 5】

即ち、測定用レファレンス画像に設定したノイズサンプリング領域の信号から単位面積当たりのノイズを求め、測定用レファレンス画像の測定領域の信号からこの信号を差し引いて測定用レファレンス画像の検出信号とする。同様に、測定用サンプル画像に設定したノイズサンプリング領域の信号から単位面積当たりのノイズを求め、測定用サンプル画像の測定領域の信号からこの信号を差し引いて測定用サンプル画像の検出信号とする。

【0 1 0 6】

そして、微小点 2 5 の標準面積当たりの信号強度を算出する（ステップ S 2 0）。

【0 1 0 7】

即ち、各参照微小点 3 6 に対応する測定用レファレンス画像の測定領域内における検出信号の総和を計算し、 $P_R$  とする。さらに、複数の微小点 2 5 に対応する検出信号の総和  $P_R$  の最大値を  $P_{Rmax}$  とする。また、各微小点 2 5 に対応する測定用サンプル画像の測定領域内での検出信号の総和を算出し  $P_{D0}$  とする。次いで、微小点 2 5 の標準面積当たりの信号強度  $P_D$  を以下の（1 3）式を用いて算出する。これらの信号強度は励起光むら、励起光ノイズ及び微小点形成誤差により生じる強度誤差が除去された強度として得られる。

【0 1 0 8】

【数 1 1】

$$P_D = \frac{D_0}{D} \cdot \frac{P_R}{P_{Rmax}} P_{D0} \quad \dots (13)$$

【0 1 0 9】

以上のような本実施の形態によれば、バイオチップ 2 4 の輝度測定に当たりレ

ファレンスチップ 3 6 を用いて励起光量の補正を行っているので、励起光の空間的、時間的な変動をキャンセルすることができる。

【 0 1 1 0 】

以上実施の形態に基づいて本発明を説明したが、本発明は上述した実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内で種々の変形や応用が可能なことは勿論である。

【 0 1 1 1 】

ここで、本発明の要旨をまとめると以下のようになる。

【 0 1 1 2 】

(1) 略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点の輝度を測定する蛍光輝度測定方法であって、

前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射して蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得る第 1 の撮像工程と、

前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射することにより前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得る第 2 の撮像工程と、

該第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る抽出工程と、

該 2 値化画像をマスクとして前記第 1 の画像のうち、異物領域と重なった部分の画像を無効とする異物除去工程と、

を含むことを特徴とする蛍光輝度測定方法。

【 0 1 1 3 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態及び第 2 の実施の形態が対応する。

【 0 1 1 4 】

標識蛍光物質を励起する波長の光を照射して得た第 1 の画像を得て、前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射して得た前記被測定物に付着した異物の画像から抽出した異物領域画像によってマスクを作成し、該マスクと前記第 1 の画像との論理積をとることにより、前記第 1 の画像から異物領域を除去するので、バイオチップに付着した異物からのノイズ光を除去することができる。

【 0 1 1 5 】



輝度測定 of 誤差を少なくできる。

【 0 1 1 6 】

(2) 前記 2 値化画像 of 異物領域を一定量だけ膨脹させる膨張工程をさらに含むことを特徴とする (1) に記載 of 蛍光輝度測定方法。

【 0 1 1 7 】

この発明に関する実施 of 形態は、第 1 の実施 of 形態及び第 2 の実施 of 形態が対応する。

【 0 1 1 8 】

前記 蛍光物質を励起しない波長 of 光を照射して得た前記被測定物に付着した異物の画像を二値化処理して得られる異物領域に対して光学的なボケ量を考慮した距離だけ、異物領域を膨脹処理してマスクを作成し、該マスクと標識 蛍光物質を励起する波長 of 励起光を照射して得た第一 of 画像と論理積をとる。

【 0 1 1 9 】

異物領域を膨脹させているので、観察光学系 of 焦点合わせ精度が悪くても、測定誤差が大きくなるしない。

【 0 1 2 0 】

(3) 測定された微小点 of 輝度を微小点 of 基準面積を用いて正規化する正規化工程をさらに含むことを特徴とする (1) 又は (2) に記載 of 蛍光輝度測定方法。

【 0 1 2 1 】

この発明に関する実施 of 形態は、第 1 の実施 of 形態が対応する。

【 0 1 2 2 】

微小点内 of 画素 of 輝度を積算して、微小点 of 基準面積により輝度測定値を正規化する。

【 0 1 2 3 】

微小点 of 面積がばらついてても、輝度測定値 of 誤差が小さくなる。

【 0 1 2 4 】

(4) 前記異物除去工程後に各微小点 of 面積を求め、該面積と微小点 of 基準面積 of 比率によって、測定値 of 信頼性を判定する信頼性判定工程をさらに含むこ



とを特徴とする（１）乃至（３）の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【 0 1 2 5 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 2 6 】

微小点の基準面積と実際の微小点の面積とから、基準面積に対する実面積の比率を計算して、予め設定した閾値と比較する。

【 0 1 2 7 】

測定値の信頼性を定量的に判定できる。

【 0 1 2 8 】

（５） 前記第 2 の画像をレファレンス画像により補正する補正工程をさらに有することを特徴とする（１）乃至（４）の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【 0 1 2 9 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 3 0 】

レファレンス画像により励起光のむらを測定し、これにより第 2 の画像を補正する。

【 0 1 3 1 】

励起光に空間的なむらが有っても、全ての異物を正しく認識できるようになる。

【 0 1 3 2 】

（６） 前記抽出工程は、前記第 2 の画像から得られる微分画像を用いて前記 2 値化画像を得ることを特徴とする（１）乃至（４）の何れかに記載の蛍光輝度測定方法。

【 0 1 3 3 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 3 4 】

第 2 の画像から得られる微分画像を用いて、該第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る。

【 0 1 3 5 】

レファレンス画像を用いることなく、励起光に空間的なむらが有っても、全ての異物を正しく認識できるようになる。

【 0 1 3 6 】

(7) 前記抽出工程は、前記 2 値化画像の 2 値化レベルを各画素に対応する微分信号の度数分布により定めることを特徴とする (6) に記載の蛍光輝度測定方法。

【 0 1 3 7 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 3 8 】

2 値化のための閾値を、各画素に対応する微分信号の度数分布により定める。

【 0 1 3 9 】

適切な閾値の設定が行える。

【 0 1 4 0 】

(8) 前記微分信号に対応する微小領域での強度で前記微分信号を規格化することを特徴とする (6) 又は (7) に記載の蛍光輝度測定方法。

【 0 1 4 1 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 4 2 】

微分信号に対応する微小領域での強度で微分信号を規格化し、それに基づいて 2 値化のための閾値を設定する。

【 0 1 4 3 】

さらに適切な閾値の設定が行え、複数種類の異物を正しく認識できるようになる。

【 0 1 4 4 】

(9) 略平面を有する基板上に配列された蛍光物質を含む微小点に励起光を照射して得られる蛍光像の輝度を測定する蛍光輝度測定装置であって、

光源と、

励起光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記蛍光物質の像を形成する為の結像手段と、

発生した蛍光の波長のみを選択する第 2 の波長選択手段と、  
 蛍光像を走査して画像を得る光電変換手段と、  
 該画像を記憶する記憶手段と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起できる波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、蛍光物質を含む微小点の画像を第 1 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記第 1 の波長選択手段を制御して、前記光源からの光のうち前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射すると共に、前記第 2 の波長選択手段を制御して、前記光電変換手段により、前記基板上に付着した異物の画像を第 2 の画像として得て、前記記憶手段に記憶する処理と、

前記記憶手段に記憶された前記第 2 の画像から異物領域を抽出して 2 値化画像を得る処理と、

前記 2 値化画像をマスクとして前記記憶手段に記憶された前記第 1 の画像のうち、前記異物領域と重なった部分の画像を無効とする処理と、  
 を行う画像処理手段と、  
 を具備することを特徴とする蛍光輝度測定装置。

【 0 1 4 5 】

この発明に関する実施の形態は、第 1 の実施の形態が対応する。

【 0 1 4 6 】

標識蛍光物質を励起する波長の光を照射して得た第 1 の画像を得て、前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射して得た前記被測定物に付着した異物の画像から抽出した異物領域画像によってマスクを作成し、該マスクと前記第 1 の画像との論理積をとることにより、前記第 1 の画像から異物領域を除去するので、バイオチップに付着した異物からのノイズ光を除去することができる。

【 0 1 4 7 】

輝度測定の誤差を少なくできる。

【 0 1 4 8 】

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明によれば、バイオチップ上の表面近傍に異物が存在した場合でも、測定誤差を少なくすることが可能であり、異物の存在を認識して輝度測定値の信頼性を定量的に判断することができる蛍光輝度測定方法及び装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の第 1 の実施の形態において微小点の輝度を測定する際のデータ処理方法の概要図である。

【図 2】

(A) は第 1 の実施の形態に係る蛍光輝度測定装置の概要を示す構成図であり、(B) はバイオチップのフォーマットを示す概要図である。

【図 3】

(A) はバイオチップに用いる蛍光物質の吸収波長と蛍光波長の相対強度との分光特性の一例を示した図、(B) は蛍光測定用フィルタユニットの分光透過率特性を示した図であり、(C) は異物画像撮影用フィルタユニットの分光透過率特性を示した図である。

【図 4】

(A) は 1 つの微小点に対する分割画像を示す図であり、(B) は (A) に表示されている線分 A B 上の C C D からの出力信号を示す図である。

【図 5】

(A) は異物が存在する y 方向の位置における x 方向の画素位置に対する輝度信号 S を表す図であり、(B) は最大輝度  $S_{\max}$  の  $1/2$  を閾値としたときの 2 値化結果を示す図である。

【図 6】

(A) はレファレンス画像の輝度分布特性を示す図であり、(B) は 2 種類の異物が混在する場合の適切な閾値の設定方法を説明するためのもので、横軸を均等分割した微分信号 S' の代表値、縦軸をこの微分信号 S' に該当する画素の総数とする度数分布図である。

【図 7】

(A) は図 5 の (A) の輝度信号にレファレンス輝度信号  $S_R$  に対する最大輝度信号  $S_{Rmax}$  の比  $S_{Rmax} / S_R$  を乗じた値を輝度信号  $S'$  とした場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する輝度信号  $S'$  を表す図であり、(B) は最大値  $S_{max}'$  の  $1/2$  を閾値としたときの 2 値化結果を示す図である。

【図 8】

(A) は一次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図であり、(B) は二次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図である。

【図 9】

(A) は微分信号を別な手法により求めたときの一次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図であり、(B) は同様に微分信号を別な手法により求めたときの二次微分オペレータを用いた場合の異物が存在する  $y$  方向の位置における  $x$  方向の画素位置に対する微分信号  $S''$  を表す図である。

【図 10】

(A) は本発明の第 2 の実施の形態に係る蛍光輝度測定装置の概要を示す構成図であり、(B) はレファレンスチップの概要図である。

【図 11】

第 2 の実施の形態による測定方法を示すフローチャートである。

【図 12】

従来の蛍光輝度測定装置の概略構成図である。

【符号の説明】

- 1 照明ユニット
- 7 蛍光測定用フィルタセット
- 8 波長選択フィルタ（励起フィルタ）
- 9, 13 ダイクロイックミラー
- 10 波長選択フィルタ（吸収フィルタ）

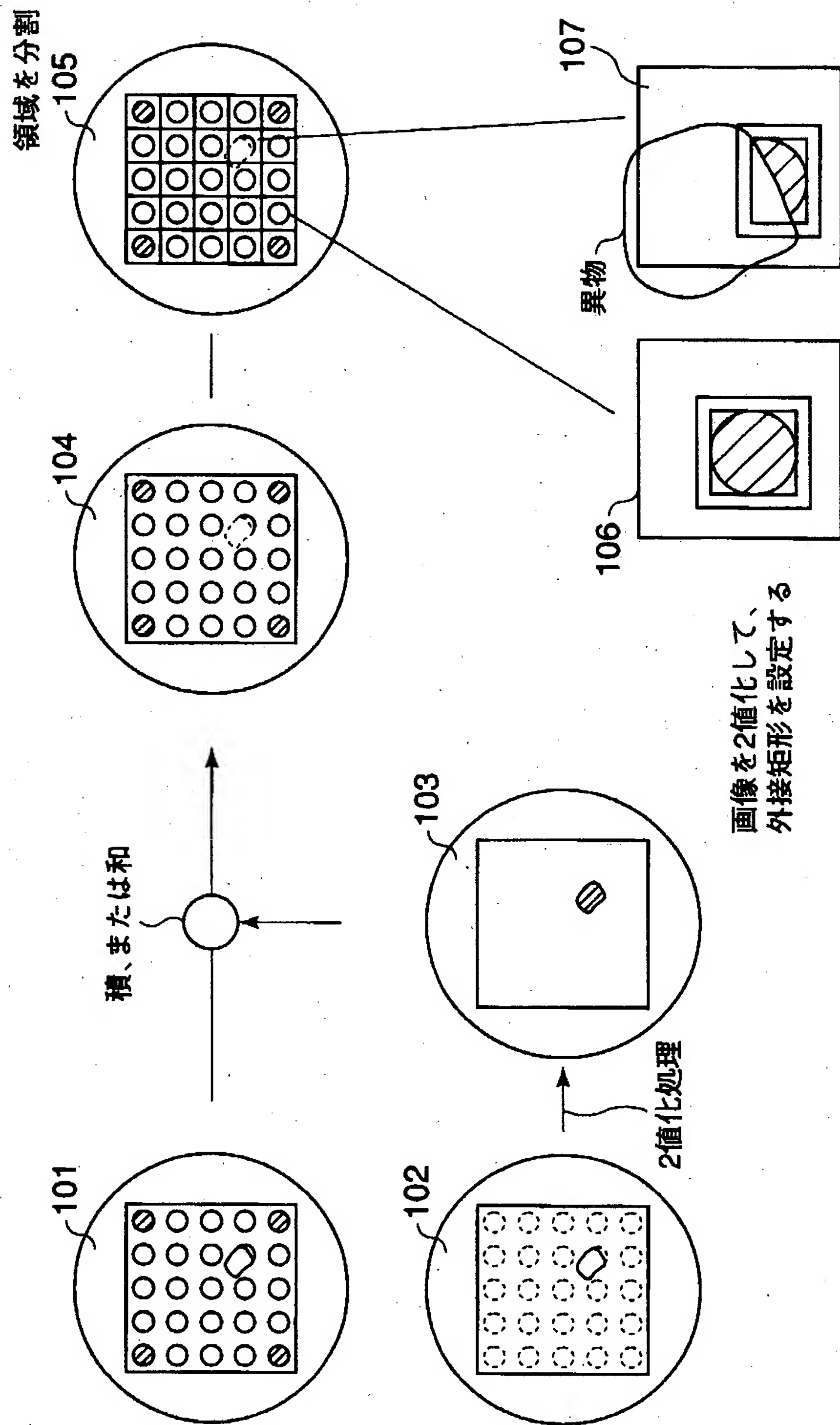


- 1 1 異物画像撮影用フィルタセット
- 1 2 波長選択フィルタ
- 1 4 フィルタ
- 1 5 フィルタセット取付部材
- 1 6 フィルタセット切替機構
- 1 7 結像レンズ
- 1 8 C C D 素子
- 1 9 A / D 変換器
- 2 0 フィルタセット制御手段
- 2 1 画像メモリ
- 2 2 画像処理手段
- 2 3 制御手段
- 2 4 バイオチップ
- 2 5 微小点
- 3 4 対物レンズ
- 3 5 位置検出用微小点
- 3 6 レファレンスチップ
- 3 7 参照微小点
- 3 8 N D フィルタ制御手段
- 3 9 N D フィルタ
- 4 0 フィルタ保持手段
- 4 1 N D フィルタ切替手段
- 4 2 演算手段
- 1 0 1、1 0 4 蛍光画像
- 1 0 2 異物画像
- 1 0 3 異物領域画像
- 1 0 6、1 0 7 分割画像

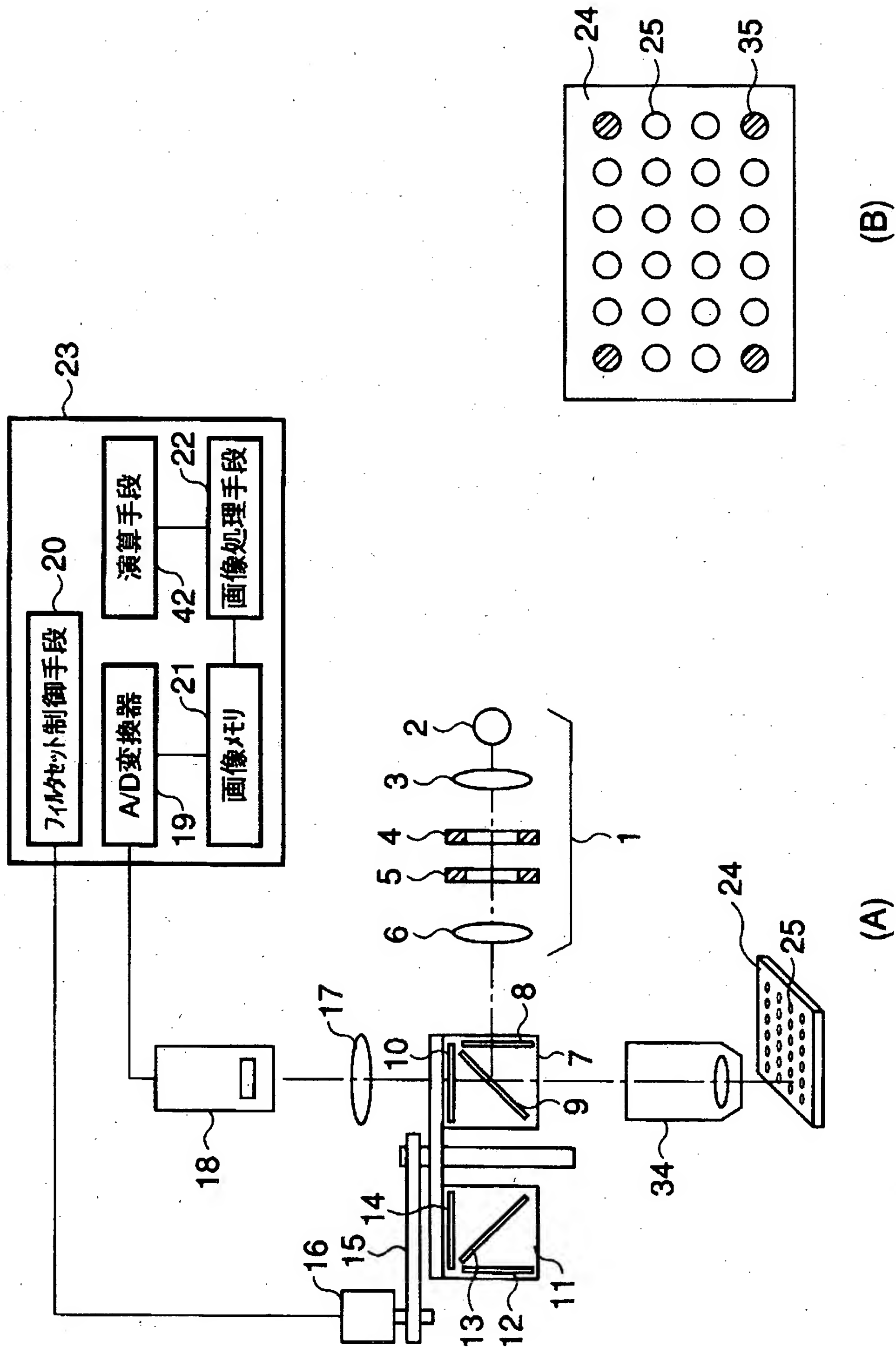
【書類名】

図面

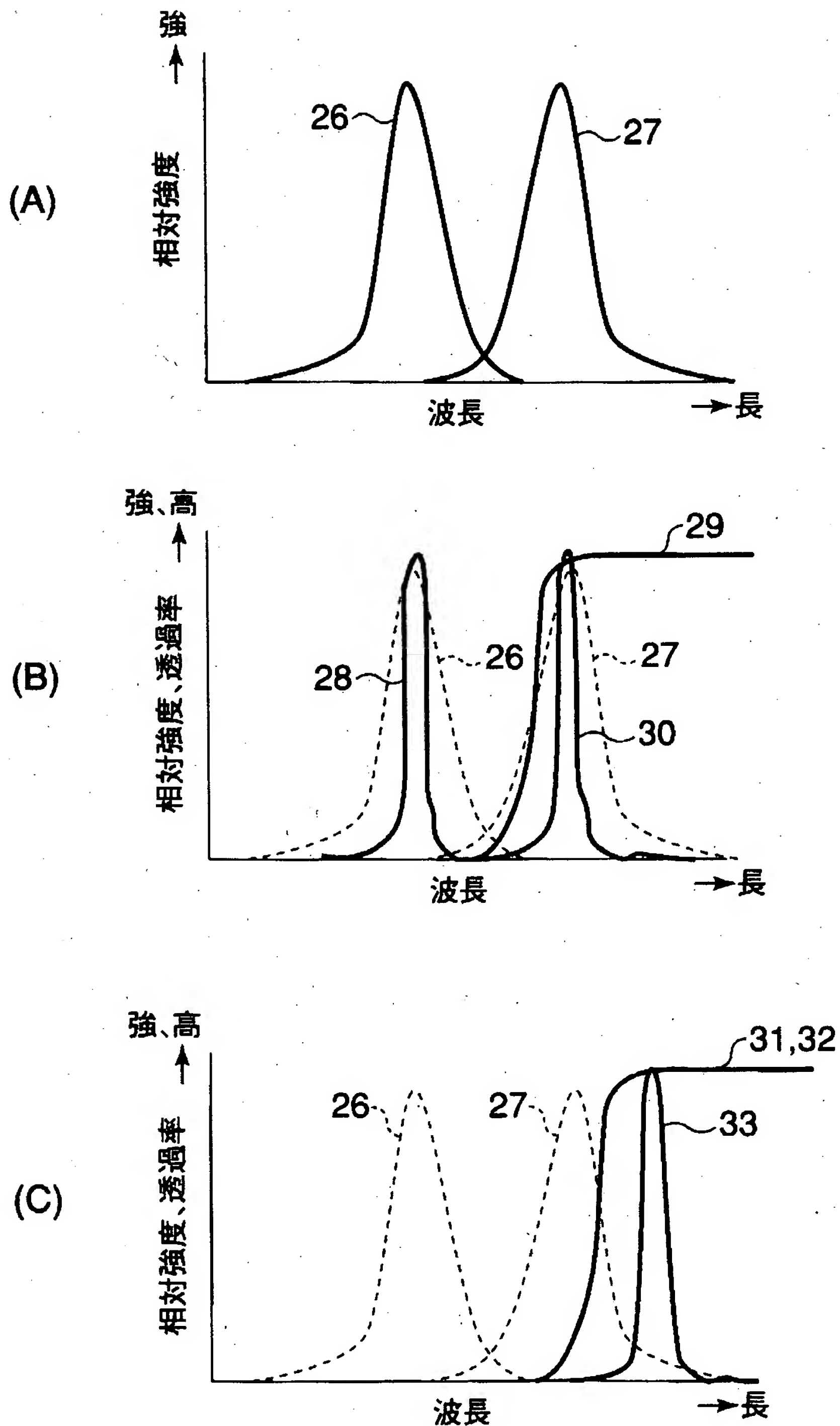
【図 1】



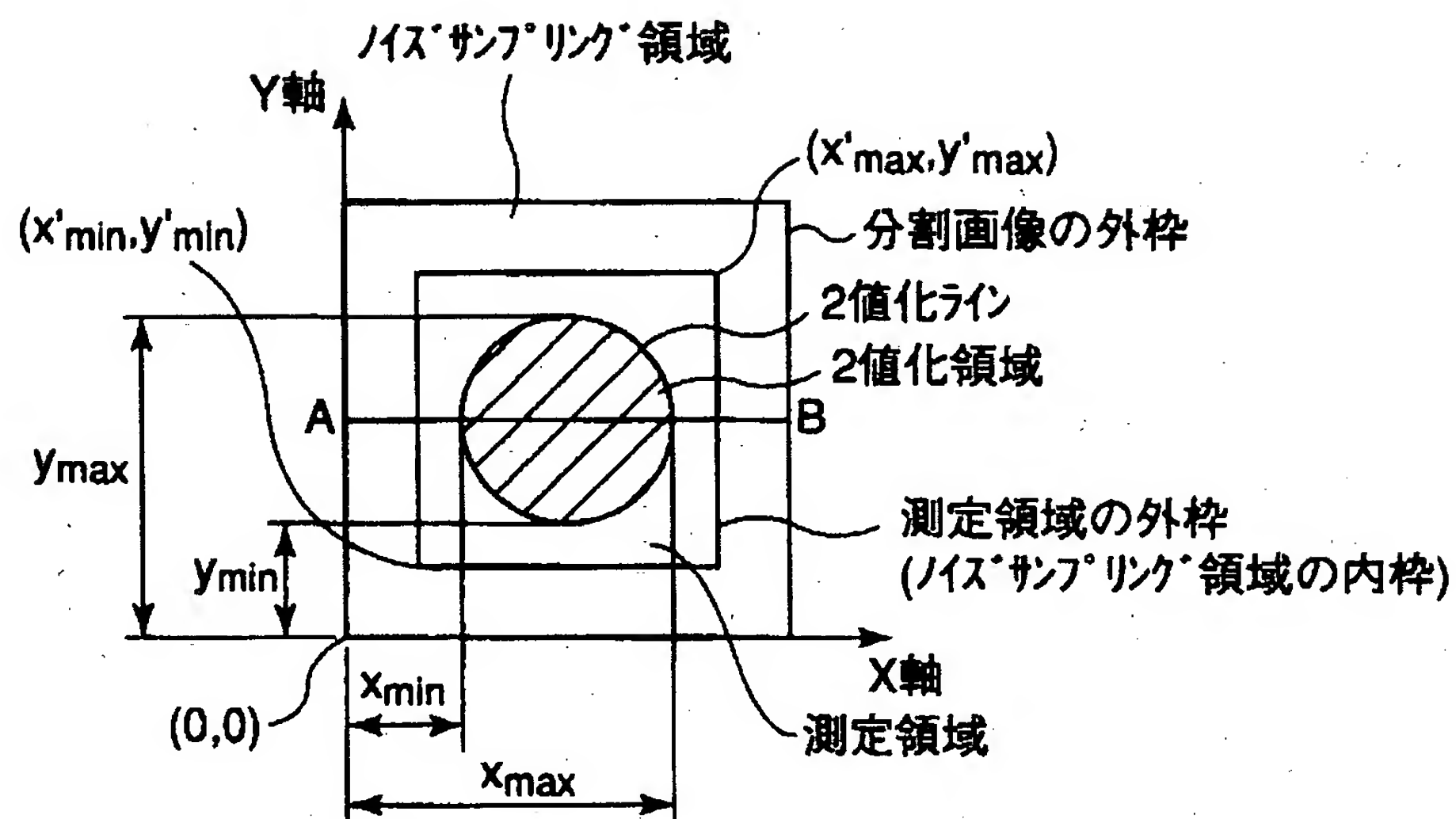
【図 2】



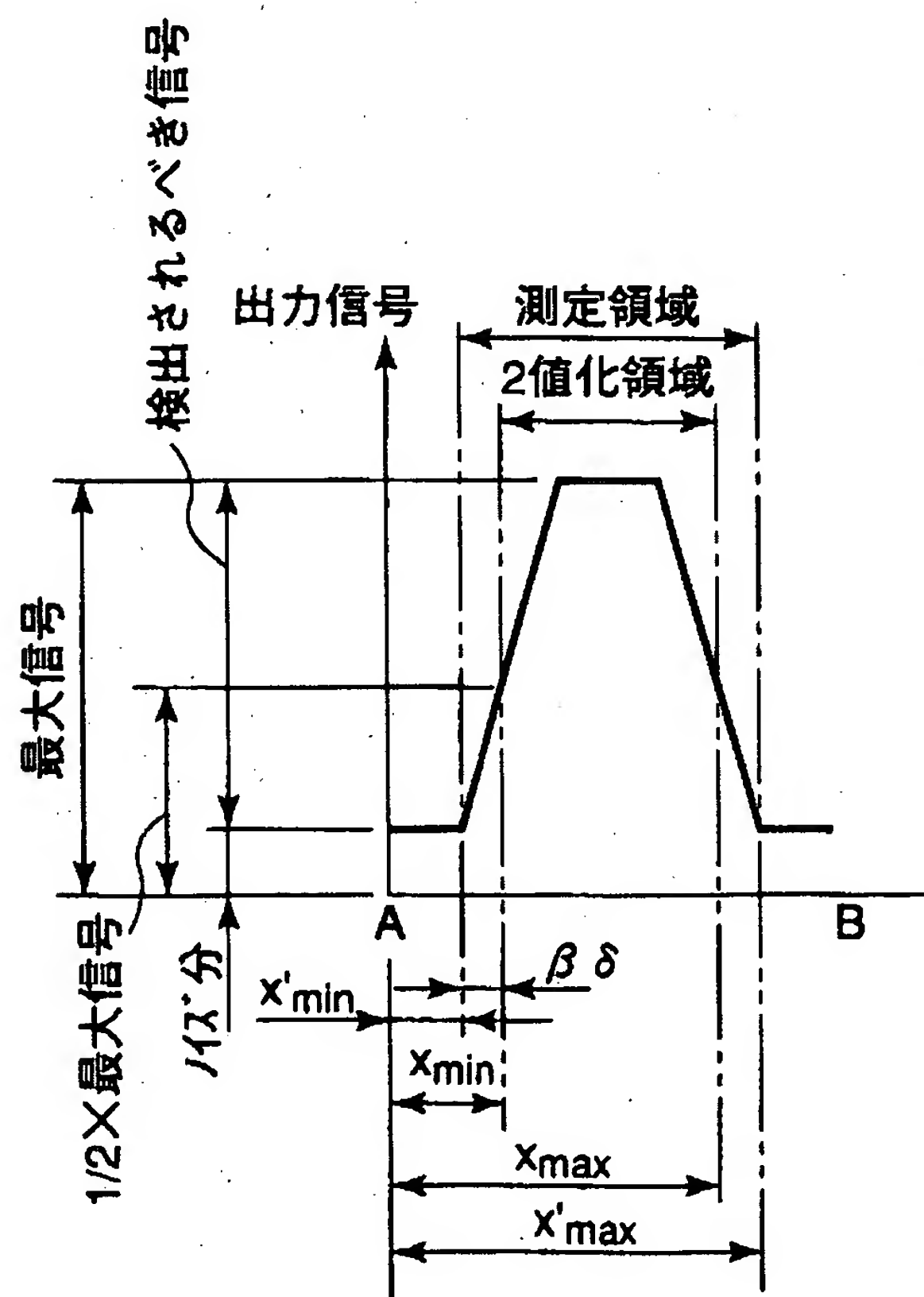
【図 3】



【図 4】

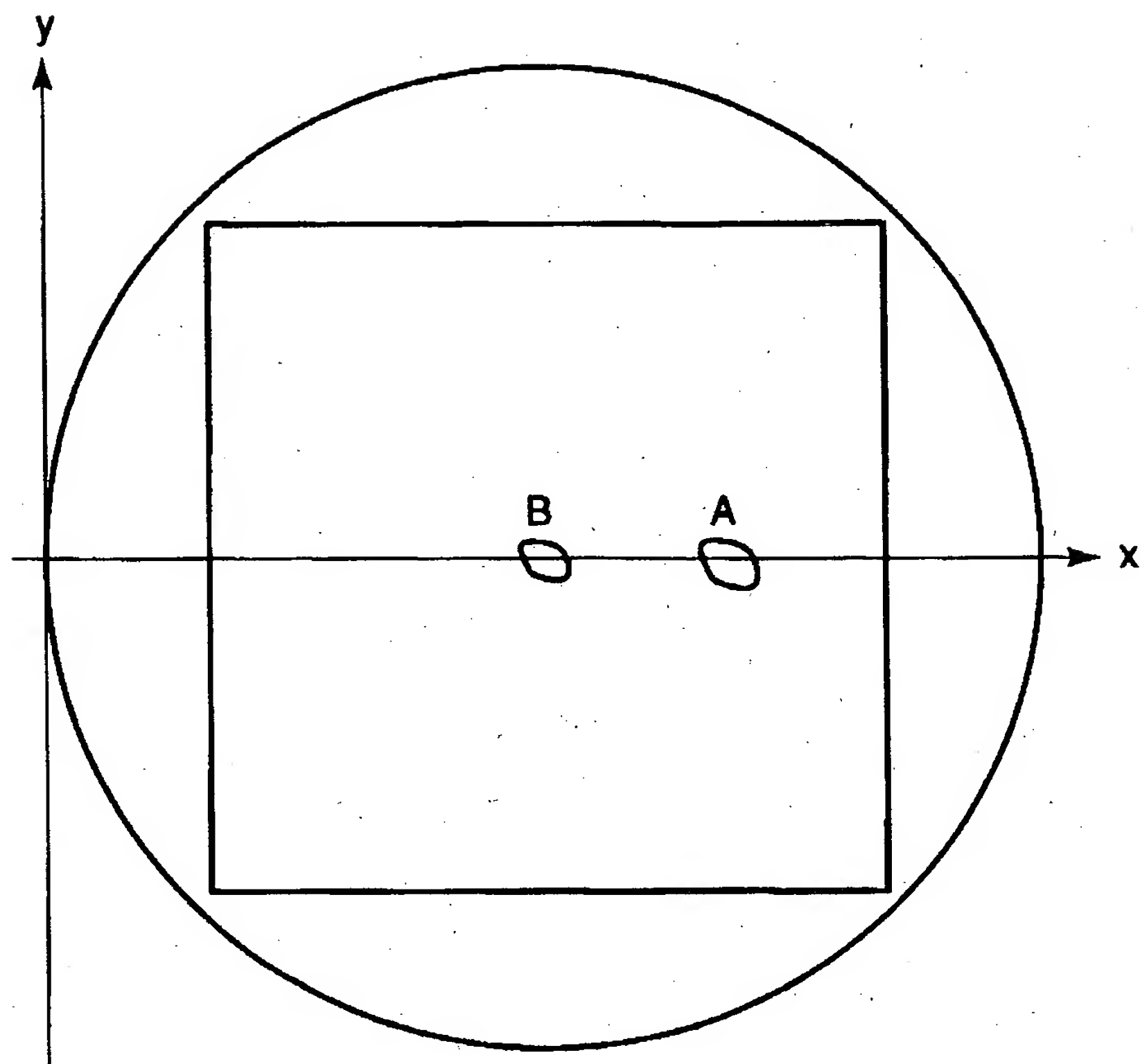


(A)

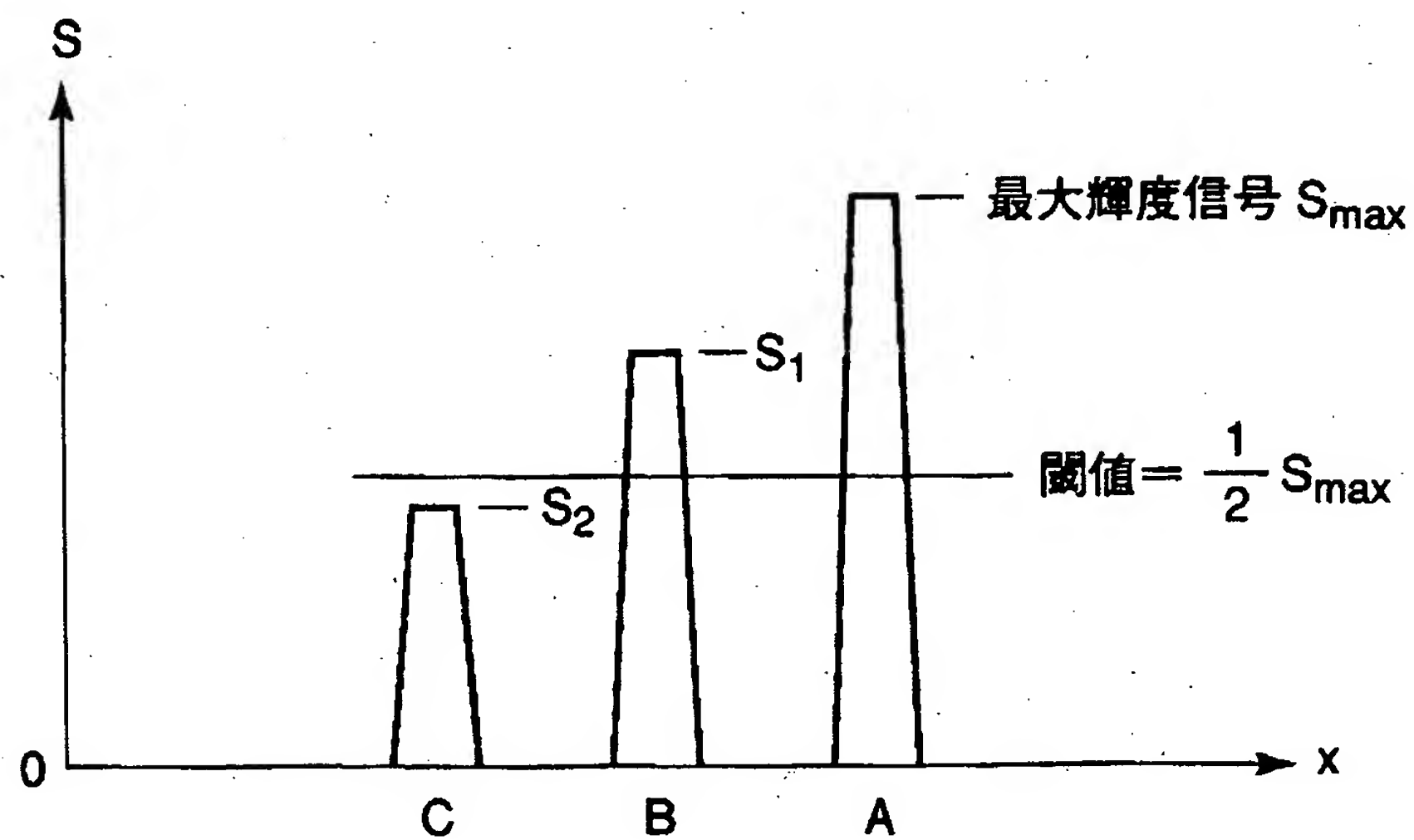


(B)

【図 5】



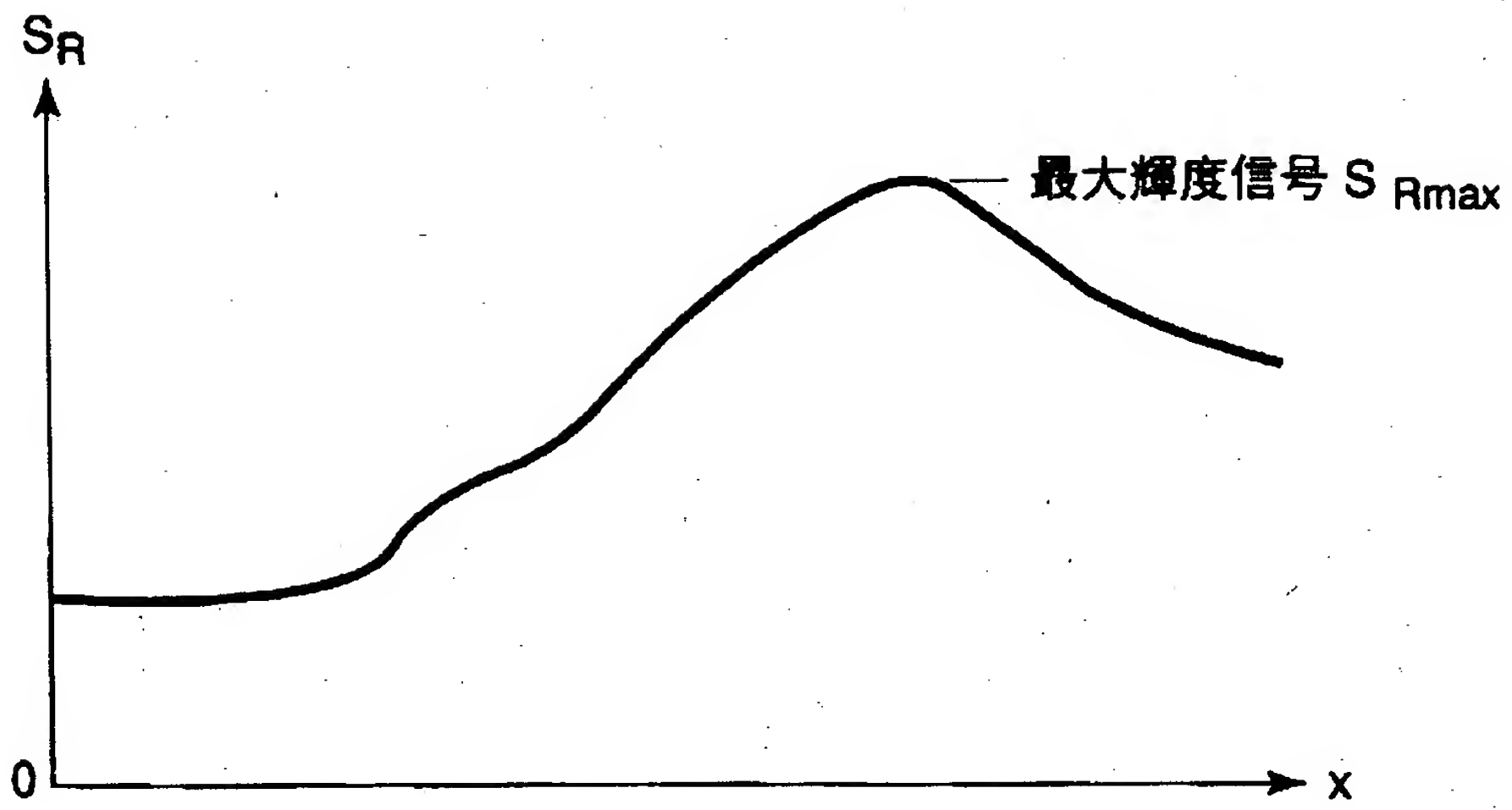
(B)



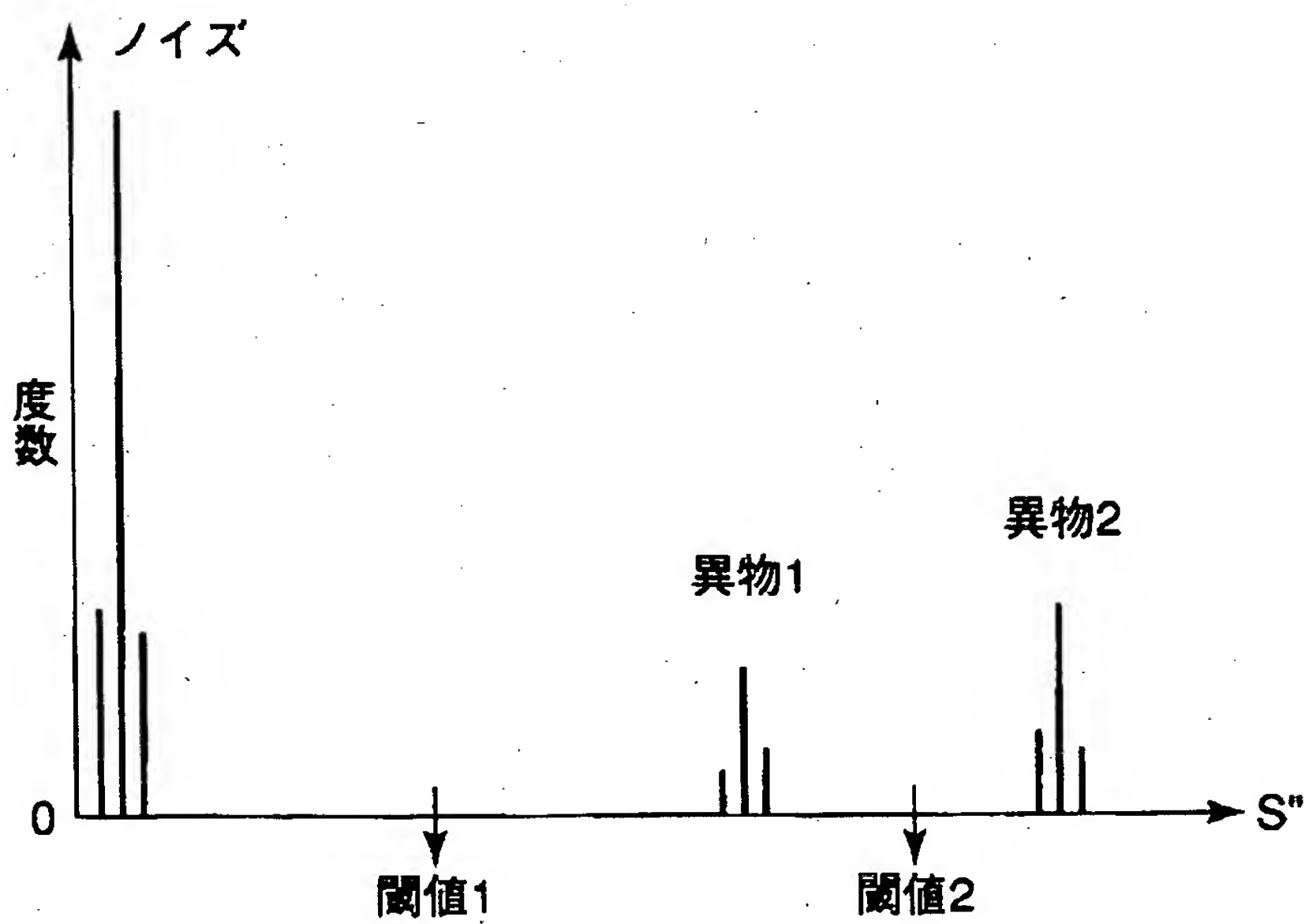
(A)



【図 6】

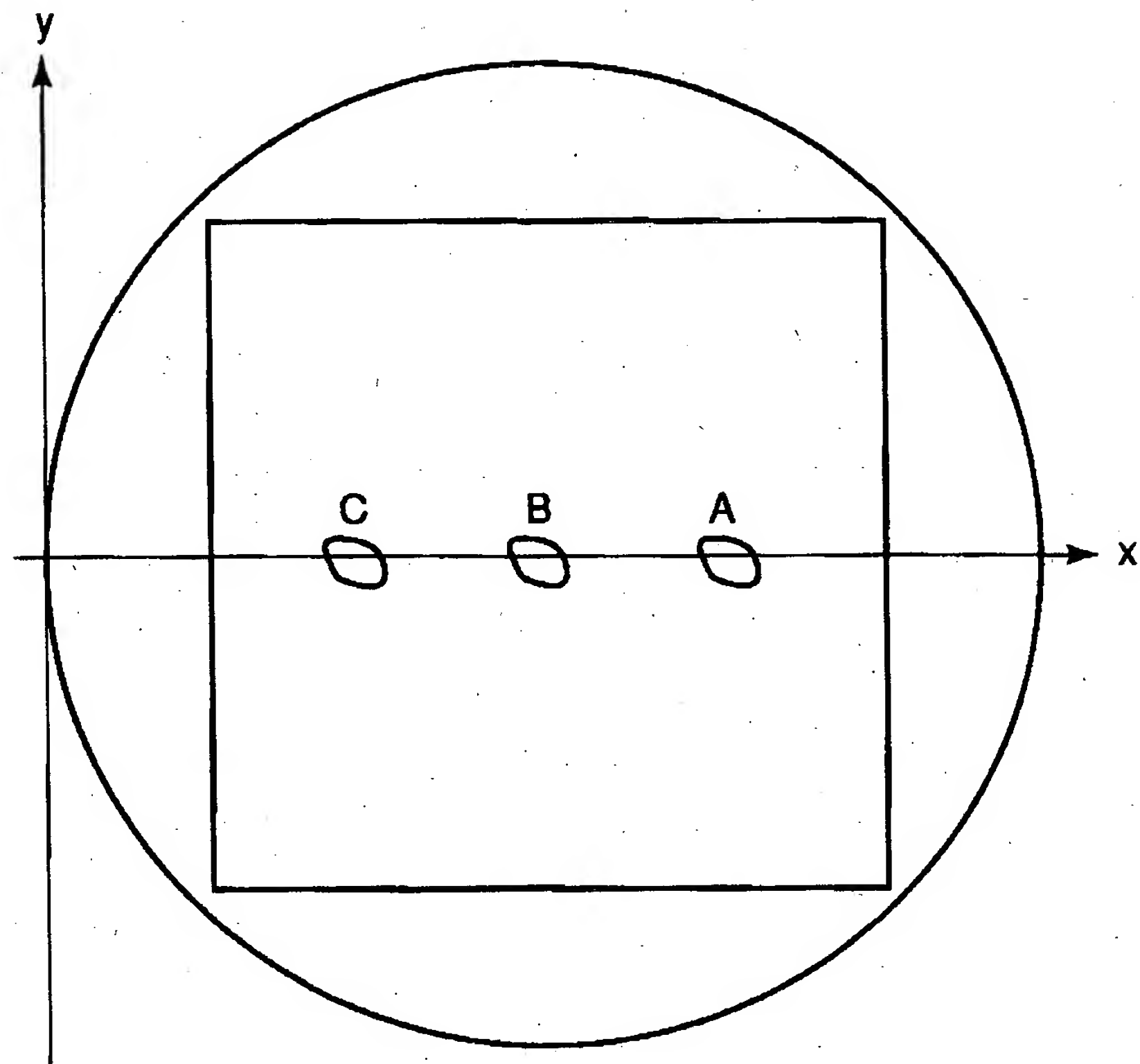


(A)

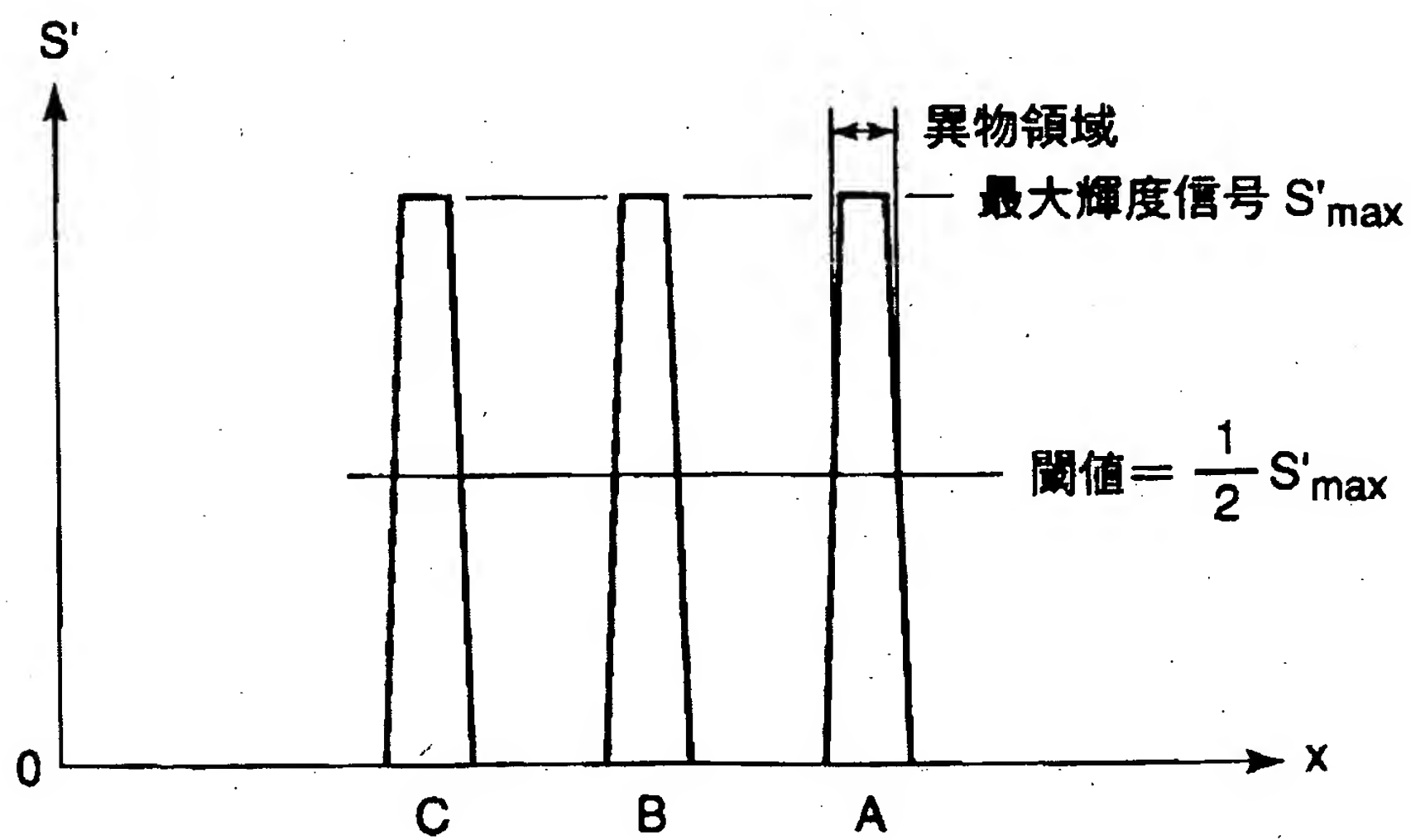


(B)

【図 7】

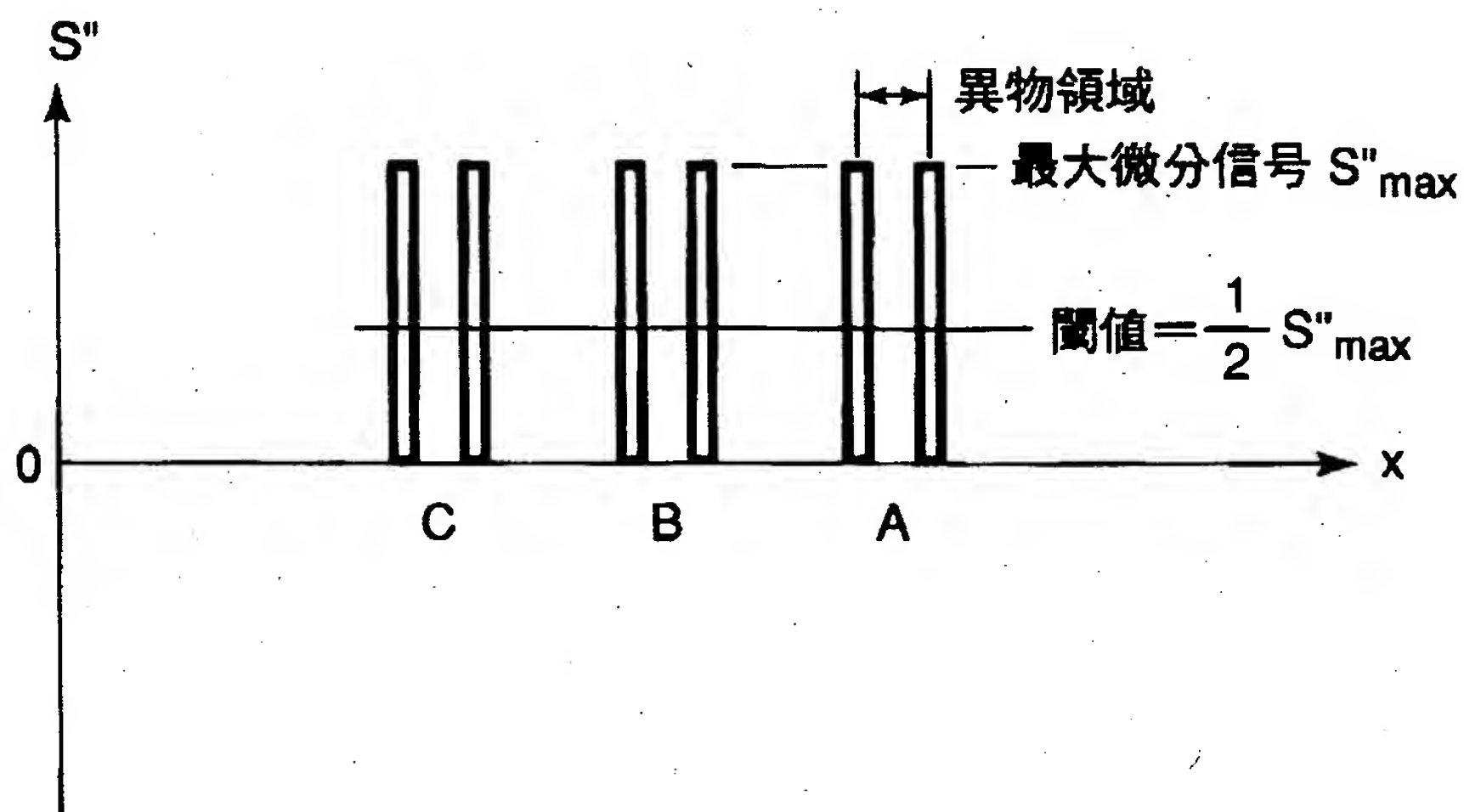


(B)

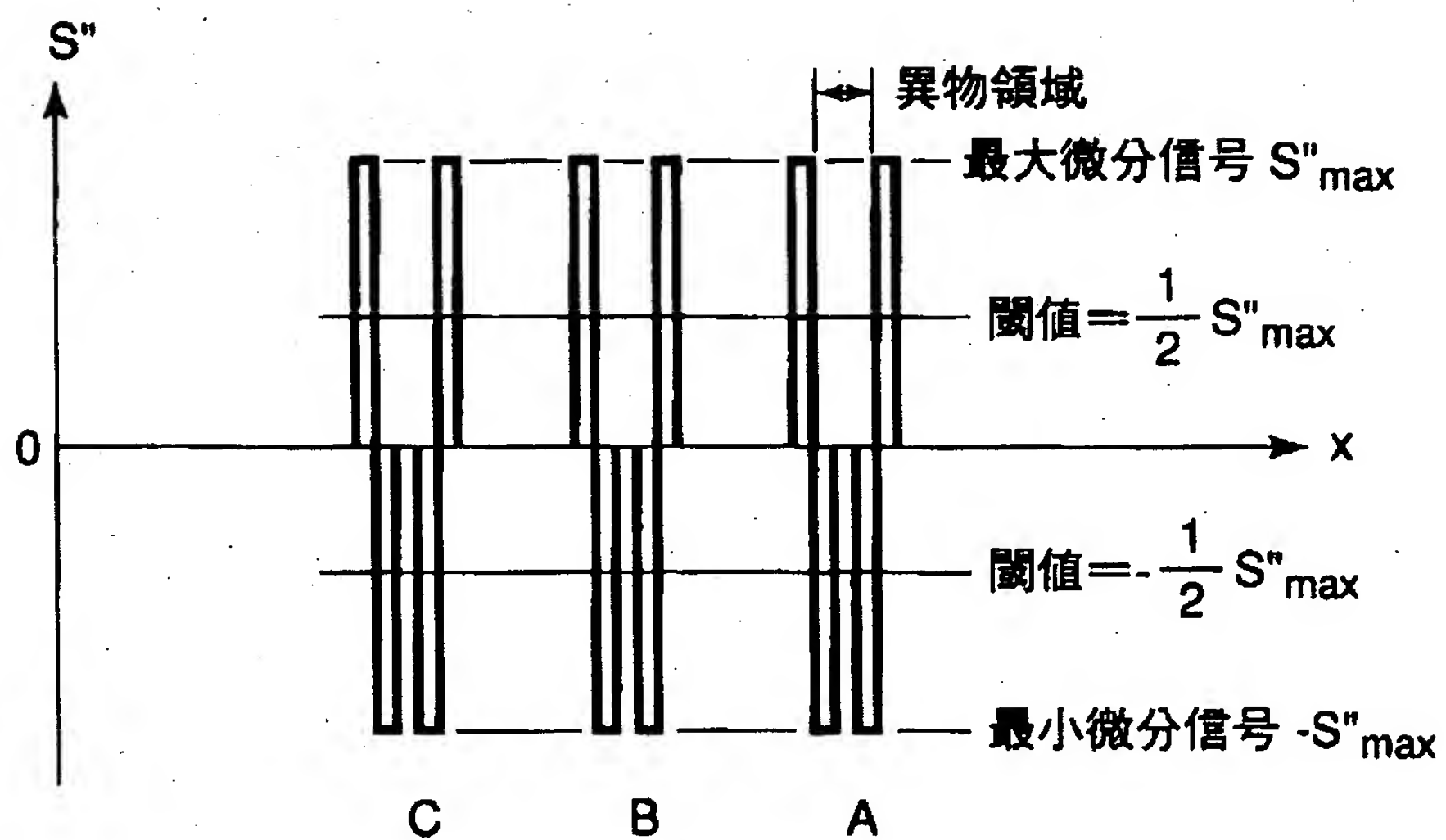


(A)

【図 8】

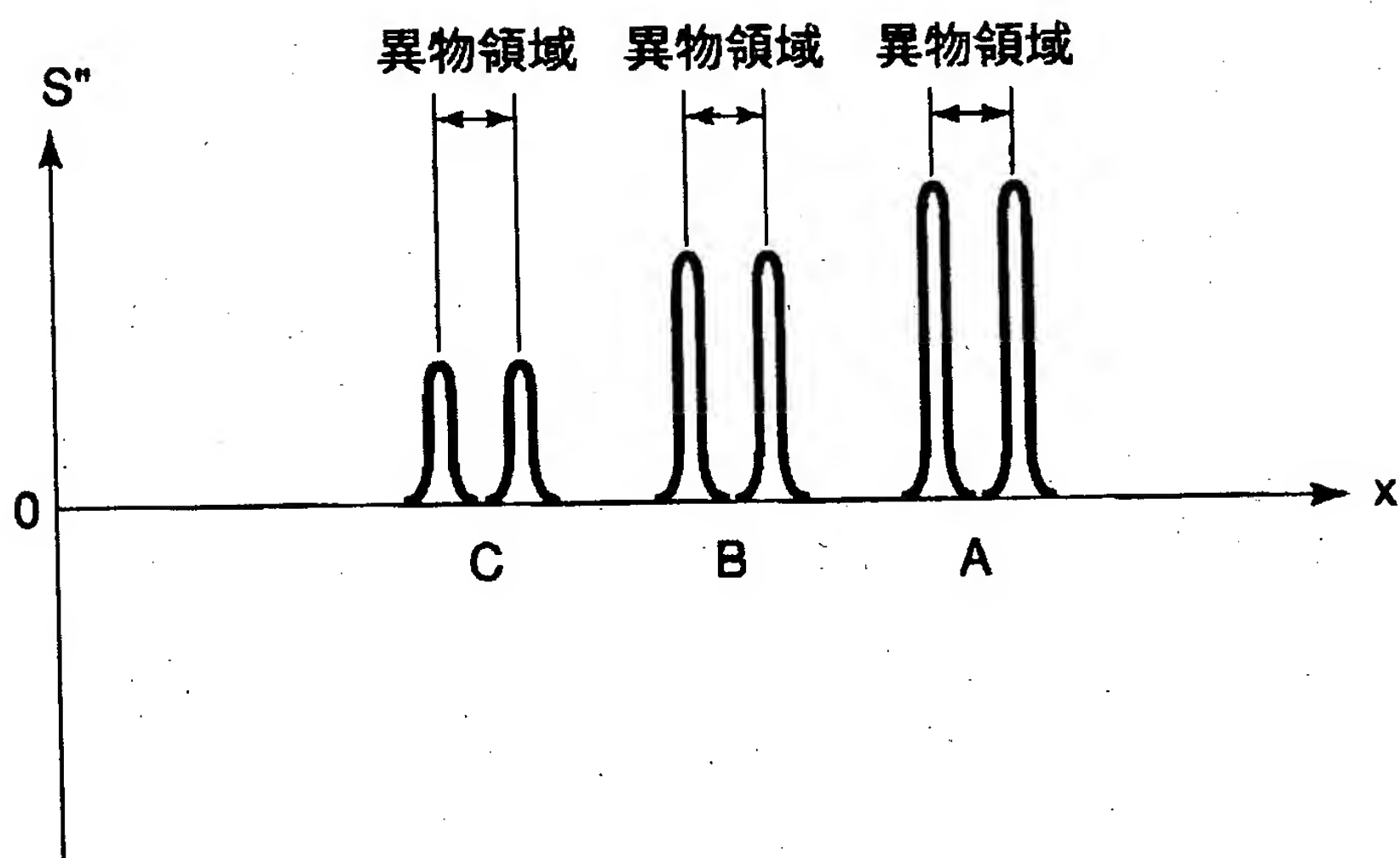


(A)

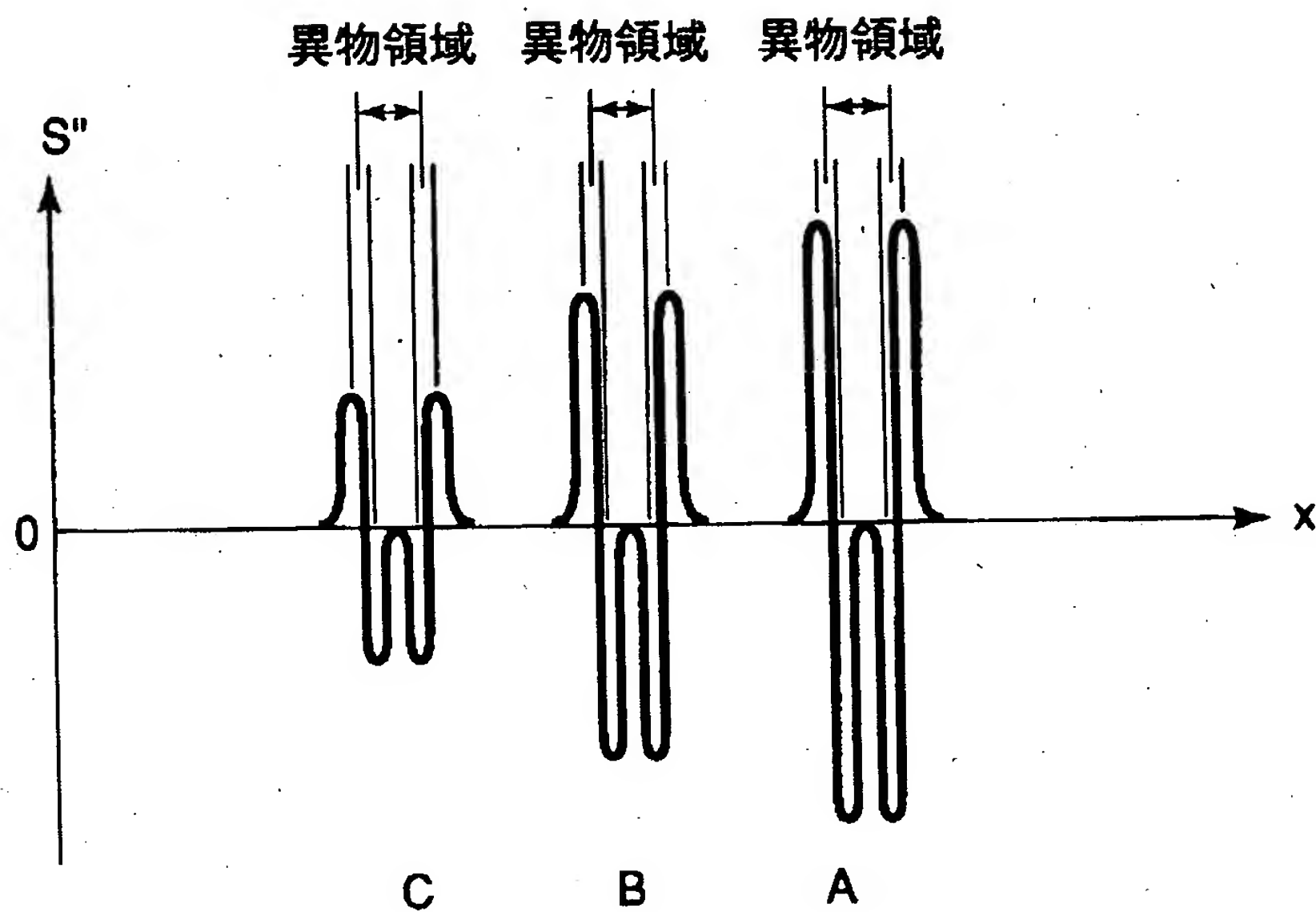


(B)

【図 9】

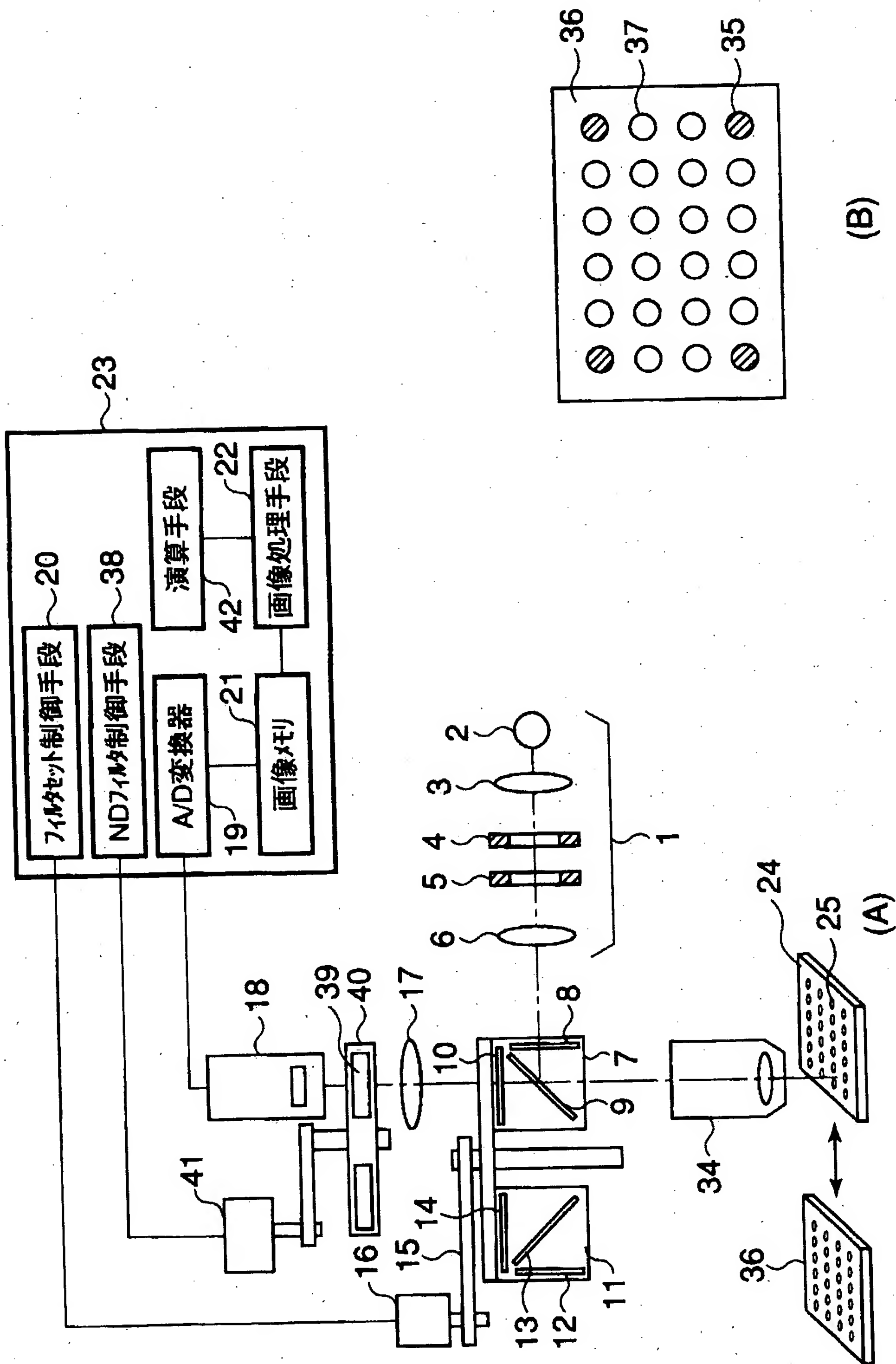


(A)

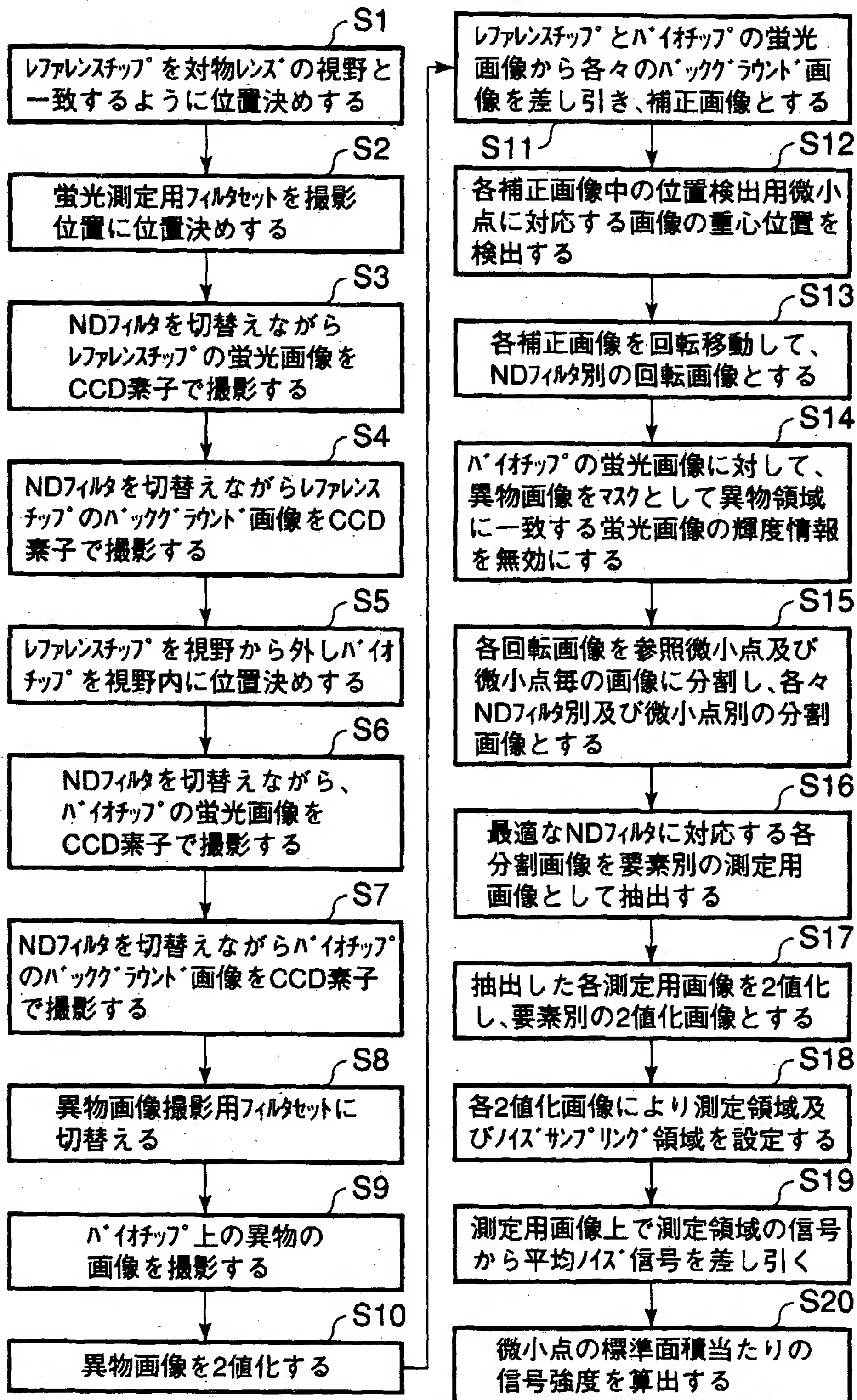


(B)

【図10】

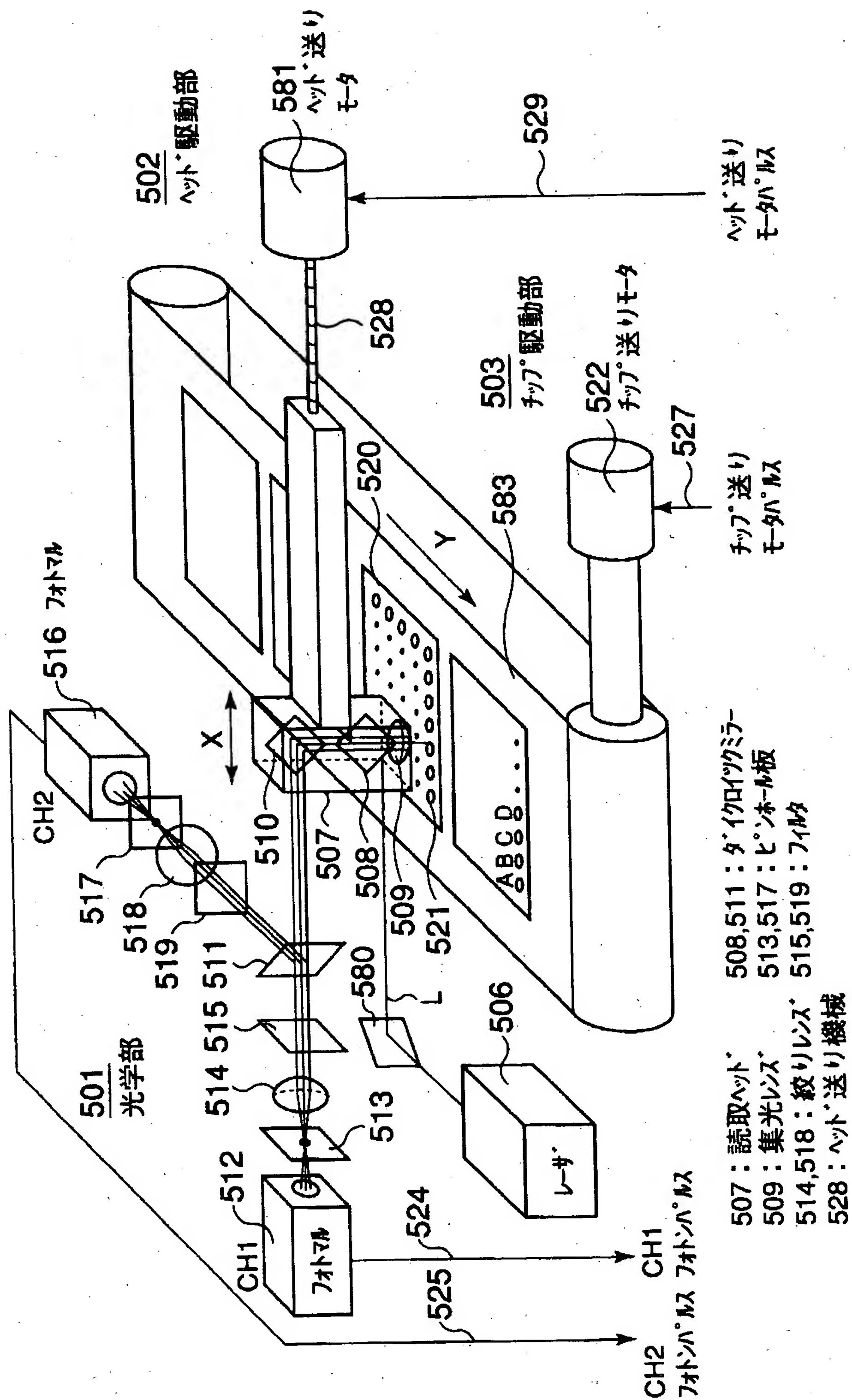


【図 11】





【圖 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バイオチップ上の表面近傍に異物が存在した場合でも、測定誤差を少なくすることが可能であり、異物の存在を認識して輝度測定値の信頼性を定量的に判断することができる蛍光輝度測定方法及び装置を提供すること。

【解決手段】 標識蛍光物質を励起する波長の光を照射して蛍光画像 1 0 1 を得て、前記蛍光物質を励起しない波長の光を照射して得た前記被測定物に付着した異物の画像 1 0 2 から抽出した異物領域画像 1 0 3 によってマスクを作成し、該マスクと前記蛍光画像 1 0 1 との論理積をとることにより、前記蛍光画像 1 0 1 から異物領域を除去した蛍光画像 1 0 4 を得る。

【選択図】 図 1

出願人履歴情報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

氏名 オリンパス光学工業株式会社